

Universidade do Algarve



**Controlo da secreção e síntese da hormona de crescimento e da prolactina
em pituitárias de dourada (*Sparus aurata* L.) incubadas *in vitro*.**

Dissertação para obtenção do grau de mestre
Mestrado em Estudos Marinhos e Costeiros

Lília Figueiredo Brinca

1994



**TESES
SD**

Controlo da secreção e
síntese da hormona de
crescimento e d. Brinca.

18073



Universidade do Algarve

**Controlo da secreção e síntese da hormona de crescimento e da prolactina
em pituitárias de dourada (*Sparus aurata* L.) incubadas *in vitro*.**

Dissertação para obtenção do grau de mestre
Mestrado em Estudos Marinhos e Costeiros

Lília Brinca
6.10.94

Lília Figueiredo Brinca

1994

615 96	18073
59 f	
BKI. 4on	

Agradecimentos

À minha família, de quem recebi o maior incentivo e ajuda para este trabalho. À minha orientadora, Prof.^a Doutora Deborah Power, pela disponibilidade permanente para ajudar, pela sua grande capacidade de transmissão do conhecimento, pela tranquilidade que conseguiu transmitir nos momentos em que tudo parecia desabar, pela exigência do fazer bem feito, tão importante em qualquer nível de ensino. Ao Prof.^o Doutor Adelino Canário pelo auxílio técnico que sempre dispensou. À Dr.^a Cecília Santos, que amavelmente sempre se prontificou a ensinar e ajudar, facilitando muito uma parte considerável do meu trabalho. À Eng.^a Elsa Couto pela sua permanente disponibilidade em colaborar. À Dr.^a Dulce Estêvão, que tão amavelmente se prontificou a rever e criticar o texto. À Prof.^a Nídia Braz, por ter acreditado na minha vontade de aprender.

Resumo

O peixe utilizado no presente trabalho, a dourada (*Sparus aurata* L.), é uma espécie importante para a aquacultura ao longo de toda a costa mediterrânea. A hormona de crescimento (GH) e a prolactina (PRL), libertadas pela glândula pituitária deste teleósteo, regulam dum modo fundamental alguns processos fisiológicos, particularmente o crescimento. No presente trabalho foi estudado o efeito que diferentes peptídeos exercem na actividade das células de prolactina e das células somatotrópicas. A pituitária de *Sparus aurata* L. incubada *in vitro* foi adicionada somatostatina (SS-14), o factor libertador da hormona de crescimento (GRF) e galanina; foi também estudado o efeito da galanina em pituitárias de peixes tratados *in vivo* com estradiol 17- β . A hormona de crescimento e prolactina, sintetizadas *de novo* e retidas na pituitária ou libertadas para o meio de cultura ao fim de 48 horas de tratamento, foram marcadas adicionando ao meio ^3H -leucina. As hormonas, após separação por SDS-electroforese em gel de poliacrilamida, foram identificadas por "Western blotting" utilizando anticorpos da PRL do salmão e da GH da dourada. A quantificação das hormonas foi feita por leitura em espectrómetro de cintilação, após completa solubilização das tiras de gel contendo as proteínas.

A somatostatina, cujo efeito inibitório da síntese e secreção de GH tem sido demonstrada em alguns teleósteos, na maior parte das experiências do presente trabalho estimulou a actividade das células somatotrópicas. É provável que este resultado contraditório esteja relacionado com as elevadas doses utilizadas (8-80 $\mu\text{g/ml}$). Uma dose mais baixa (0,5 $\mu\text{g/ml}$) inibiu, embora não de forma significativa, quer a síntese quer a secreção de GH, o que pode indicar ser desta ordem de grandeza o nível fisiológico de actuação da SS-14; futuros trabalhos devem ser feitos para obter resultados mais fiáveis sobre a acção da SS-14 na síntese e secreção de GH. O GRF estimula mais a síntese do que a secreção de GH, com a intensidade do efeito dependente da dose utilizada. A galanina exerce um efeito directo sobre a pituitária, estimulando a síntese e a secreção de GH. A galanina tem uma acção antagónica sobre a actividade estimuladora do GRF na síntese de GH; sobre a secreção de GH parece não existir interacção entre os dois peptídeos. O estradiol 17- β parece actuar em sinergismo com a galanina, estimulando a síntese e a secreção de GH.

A somatostatina é um forte factor inibitório da actividade das células de PRL. A secreção e síntese de PRL são estimuladas pelo GRF, com a resposta ao estímulo dependente da dose de GRF utilizada. A galanina exerce um efeito directo sobre a pituitária, estimulando a síntese e a secreção de PRL, mas tem um acção antagónica sobre a actividade estimuladora do GRF; com o estradiol 17- β parece actuar em sinergismo, aumentando o efeito estimulador que este parece exercer sobre a síntese e a secreção de GH.

A variação sazonal da intensidade dos efeitos dos diferentes factores e do modelo de secreção da pituitária, está provavelmente relacionada com a influência que os factores ambientais e metabólicos exercem sobre a actividade das células de GH e de PRL.

Summary

The fish used in the present study, the sea bream (*Sparus aurata* L.), is an important aquaculture species along the Mediterranean coast. The growth hormone (GH) and prolactin (PRL), released by the pituitary gland of this teleost fish, play a central role in controlling several aspects of its physiology, particularly growth. In this study, we examined the effect of several peptides on the activity of somatotrophs and prolactin cells in cultured pituitary glands. Pituitaries from *Sparus aurata* L. were cultured and somatostatin (SS-14), GH-releasing factor (GRF) and galanin applied to the cultured pituitary glands; the effect of galanin in fishes treated *in vivo* with estradiol-17 β was also studied. Total GH and PRL newly synthesised and released, during a period of 48 hours, were followed using a ^3H -leucine tracer; the hormones present in the culture medium and in the pituitary homogenates were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and identified by Western blotting using rabbit antisera directed against chum salmon PRL and sea bream GH. Quantitation of labelled GH and PRL bands was made after separation by SDS-PAGE, solubilisation of the appropriate band and counting by scintillation.

Although an inhibitory effect of somatostatin on growth hormone release and synthesis has been demonstrated in teleosts, in the present study an opposite trend was observed, probably a consequence of the use of high concentrations of SS-14 (8-80 $\mu\text{g/ml}$). A much lower dose of SS-14 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) caused a non significant reduction in the release and synthesis of GH, indicating that this concentration is probably more close to the physiologic level; future investigation of the effects of this factor should be carried out. GRF has a dose-related potency and stimulated more GH synthesis than release. Galanin seems to have a direct effect at the pituitary level, stimulating the GH synthesis and release. Moreover, galanin caused a decrease in GRF stimulated GH synthesis; galanin does not interact with GRF in GH release. Estradiol 17- β apparently has a synergistic interaction with galanin, stimulating both GH release and synthesis.

Somatostatin inhibited PRL release and synthesis with a dose-dependent potency. GRF has a dose-related potency and stimulated both PRL synthesis and release. Galanin seems to have a direct effect at the pituitary level, stimulating the PRL synthesis and release, and an antagonist interaction with GRF stimulatory activity. Estradiol 17- β apparently has a synergistic interaction with galanin, stimulating both PRL release and synthesis.

Seasonal changes in the activity of somatotrophs and PRL-cells and variation of GH and PRL release modulation are probably influenced by seasonal external and/or metabolic factors.

ÍNDICE

Abreviaturas	6
PARTE I - INTRODUÇÃO	
1. Características gerais do crescimento	7
2. Estrutura e função do hipotálamo e da glândula pituitária	7
2.1 Hipotálamo	8
2.2 Glândula pituitária	8
2.2.1 Origem embrionária da pituitária	9
2.2.2 Neurohipófise	9
2.2.3 Adenohipófise	9
Células somatotrópicas	
Células de prolactina	
3. Hormona de crescimento ou somatotrofina (GH)	11
3.1 Acções da GH	12
3.2 Controlo da secreção	13
3.2.1 Secreção basal	13
3.2.2 Controlo hipotalâmico	13
Hormona libertadora da tirotrófina (TRH)	
Factor inibidor da libertação da somatotrofina (SRIF)	
Factor libertador da hormona de crescimento (GRF)	
Relação SRIF-GRF	
3.2.3 Outras hormonas	15
3.2.4 Outros peptídeos	15
3.2.5 Factores externos	16
3.4 Sinergismo entre a GH e outras hormonas	16
4. Prolactina (PRL)	
4.1 Acções da PRL	18
4.2 Controlo da secreção	18
4.2.1 Secreção basal	19
4.2.2 Controlo hipotalâmico	19
Dopamina (DA)	
Somatostatina (SS)	
Hormona libertadora de tirotrófina (TRH)	
4.2.3 Outras hormonas	20
17 β -estradiol (E2) e 17 α -20 β -diidroxiprogesterona (17-20-P)	
Cortisol	
4.2.4 Outros peptídeos	20
4.2.5 Factores externos	21
4.3 Sinergismo entre a PRL e outras hormonas	21
5. Receptores membranários das hormonas	21
6. Mecanismos de retrocontrolo	22
7. Objectivos do presente trabalho	23

PARTE II - MATERIAL E MÉTODOS

1. Incubação de pituitárias <i>in vitro</i>	24
2. Extração	25
3. Determinação espectrofotométrica da proteína total (método de Lowry)	25
4. Separação e detecção das hormonas por electroforese em gel de poliacrilamida (método de Laemmli)	26
5. "Western blotting"	30
<i>Fluxograma das etapas de cada experiência</i>	33
6. Quantificação das bandas proteicas	32
7. Plano de Amostragem	34
8. Análise estatística	35

PARTE III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização da GH e PRL de <i>Sparus aurata</i> L.	
Separação e identificação	36
Estimativas dos pesos moleculares	37
Variações sazonais na síntese de GH e PRL	38
2. Controlo sobre a síntese e secreção de GH em pituitárias incubadas <i>in vitro</i>	
Experiências sobre o efeito da somatostatina	39
Experiências sobre o efeito do GRF	42
Experiências sobre o efeito da galanina	43
Experiências sobre o efeito conjunto da galanina e GRF	44
Experiências sobre o efeito da galanina em peixes tratados <i>in vivo</i> com 17 β -estradiol ..	45
Controlo sobre a GH	46
2. Controlo sobre a síntese e secreção de PRL em pituitárias incubadas <i>in vitro</i>	
Experiências sobre o efeito da somatostatina	48
Experiências sobre o efeito do GRF	50
Experiências sobre o efeito da galanina	51
Experiências sobre o efeito conjunto da galanina e GRF	52
Experiências sobre o efeito da galanina em peixes tratados <i>in vivo</i> com 17 β -estradiol ..	53
Controlo sobre a PRL	54
BIBLIOGRAFIA	56

ABREVIATURAS

ACTH	Adrenocorticotrofina
AHP	Adenohipófise
AMP	Adenosina-5' - monofosfato
AMP _c	Adenosina-5' - monofosfato cíclico
ATP	Adenosina-5' - trifosfato
DA	Dopamina
E ₂	17 β - estradiol
GH	Hormona de crescimento, somatotrofina
GRF	Factor libertador da hormona de crescimento
GtH	Gonadotrofina
IgG	Imunoglobulina G
NHP	Neurohipófise
PPD	<i>Pars distalis proximal</i> da adenohipófise
PRL	Prolactina
Rf	Distância percorrida pelo complexo SDS-polipeptídico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPD	<i>Pars distalis rostral</i> da adenohipófise
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	SDS-PoliAcrilamida Gel Electroforese
SRIF	Factor inibidor da libertação da hormona de crescimento, somatostatina
T ₃	Triiodotironina
T ₄	Tiroxina
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
TEMED	N, N, N',N'-tetrametiletilenodiamina
TRH	Hormona libertadora da tirotrófina
VIP	Peptídeo vasoactivador do intestino
17-20-P	17 α -20 β - dihidroxiprogesterona

PARTE I - INTRODUÇÃO

1. Características gerais do crescimento

Crescimento significa uma mudança positiva da magnitude do corpo. A variável que expressa esta mudança no corpo pode ser uma dimensão física, como o comprimento, peso, volume, massa, número de anéis nas escamas; ou pode ser relacionada com o conteúdo em proteínas, lípidos e outros constituintes do corpo; ou pode ser o conteúdo energético do corpo (Weatherley and Gill, 1987).

O *crescimento real* normal resulta portanto da acumulação ordenada de tecidos - essencialmente muscular e adiposo - feita em sincronia com o alongamento do esqueleto (Phillips, 1981). Os mecanismos pelos quais se dá o crescimento real dependem da interação entre diferentes factores exógenos e endógenos: alimento - processos metabólicos controlados pelas hormonas - interação entre hormonas e ambiente.

O impacto de uma nutrição deficiente no crescimento, embora esteja relacionado com a severidade do distúrbio, depende essencialmente do estágio de desenvolvimento do organismo e consequentemente da fase de crescimento dos diferentes tecidos. Um tecido que esteja numa fase de hiperplasia, em que a síntese de DNA e a replicação celular sejam máximas, mesmo que a nutrição exógena seja melhorada terá sempre um déficit no seu número de células (Phillips, 1981). A utilização dos nutrientes depende dos processos metabólicos dirigidos pelas hormonas, o que significa que o crescimento é afectado pelas mudanças fisiológicas influenciadas pelas hormonas. Por outro lado, a actuação das hormonas depende de numerosos factores externos que interferem com a síntese e/ou segregação das hormonas, ou com o nível de sensibilidade dos órgãos alvo à recepção do estímulo das hormonas.

Assim, enquanto que o *crescimento potencial* é determinado fundamentalmente por factores genéticos, o *crescimento real* reflecte a extensão com que a expressão genética é modificada pelos meios exógeno e endógeno (Phillips, 1981).

A hormona de crescimento e a prolactina, libertadas pela glândula pituitária, regulam de um modo fundamental o crescimento (Ball, 1981; Hall *et al.*, 1986; Chester-Jones *et al.*, 1987).

2. Estrutura e função do hipotálamo e da glândula pituitária

O encéfalo dos teleósteos caracteriza-se pela sua forma alongada, pelo volume dos lobos olfactivos e pelo forte desenvolvimento do mesencéfalo e do metencéfalo. Entre a parte mais anterior do encéfalo (telencéfalo) e o mesencéfalo situa-se o diencéfalo formado dorsalmente pelo tálamo e ventralmente pelo hipotálamo ao qual se liga a glândula pituitária.

2.1 Hipotálamo

Esta formação encontra-se de um e outro lado do III ventrículo constituindo o pavimento da cavidade diencefálica e, embora de limitada área encefálica, tem um papel primordial na regulação de numerosos fenómenos fisiológicos com destaque para os sexuais e os de crescimento.

Um área restrita do hipotálamo, a médio-basal, está afectada à produção de hormonas que regulam o funcionamento das glândulas endócrinas, particularmente a glândula pituitária. Nesta área encontram-se células nervosas usualmente agrupadas em núcleos, sendo de natureza secretória os neurónios dos núcleos supra-óptico, paraventricular e arqueado.

O hipotálamo recebe mensagens sensitivas de quase todas as outras partes do Sistema Nervoso Central (SNC); geram-se então estímulos que são subsequentemente transmitidos aos neurónios secretores responsáveis pela elaboração das hormonas libertadoras hipotalâmicas (ou factores hipotalâmicos) que na pituitária causam a estimulação ou inibição da síntese e/ou secreção das hormonas produzidas por esta glândula.

2.2 Glândula pituitária

A glândula pituitária (figura I.1) mantém com o hipotálamo uma continuidade através da haste infundibular que é constituída essencialmente por fibras nervosas e vasos sanguíneos. Duma maneira geral nos teleósteos não existe o sistema porta hipofisário, característico das outras classes de vertebrados; as fibras nervosas, com origem no hipotálamo, terminam na pituitária directamente em vasos sanguíneos ou formam terminais semelhantes a sinapses na lâmina basal da adenohipófise. Em algumas espécies, passam através de espaços na lâmina basal e terminam directamente nas células glandulares da adenohipófise (Moons *et al.*, 1988; Moons *et al.*, 1989). A inexistência de um sistema portal hipotálamo-hipófise parece não ser comum a todos os peixes; estudos recentes em *Megalops cyprinoides* sugerem a presença, nos teleósteos primitivos, daquele sistema (Baskaran e Sathyanesam, 1992).

A glândula pituitária é constituída por duas partes (a neurohipófise e a adenohipófise) que são diferentes quer na sua origem embrionária quer estrutural e funcionalmente.

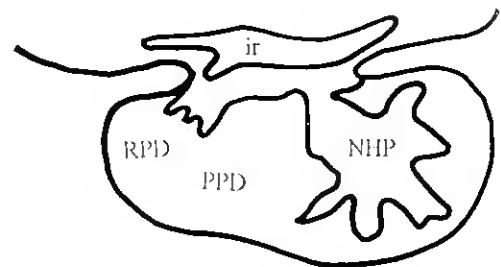


Figura I.1 - Esquema de uma secção longitudinal da glândula pituitária de um peixe adulto da espécie *Sparus aurata* L. (adaptado de Power e Canário, 1992).

A adenohipófise está dividida em três partes: a *pars distalis rostral* (RPD), área onde estão localizadas as células que segregam prolactina e as células corticotrópicas, a *pars distalis proximal* (PPD), constituída por células somatotrópicas e gonadotrópicas e a *pars intermedia*, profundamente invadida pelo tecido nervoso da neurohipófise (NHP). O *recessus infundibularis* está indicada por ir.

2.2.1 Origem embrionária da pituitária

Tem-se considerado que a neurohipófise e a adenohipófise são ambas de proveniência ectodérmica. A neurohipófise forma-se de uma evaginação do pavimento do diencéfalo embrionário ao nível da sua porção hipotalâmica, que desce em direcção à cavidade bucal; a adenohipófise provém da bolsa de Rathke, que é uma evaginação dorsal da ectoderme da cavidade bucal. A bolsa permanece só transitoriamente em conexão directa com a cavidade bucal do embrião separando-se desta e crescendo preferencialmente para os lados, de molde a vir a cobrir a porção originada do pavimento do hipotálamo.

2.2.2 Neurohipófise

A neurohipófise (NHP) é constituída essencialmente por ramificações das fibras nervosas amielínicas da haste infundibular. As fibras são os axónios dos neurónios do hipotálamo; além destas existem os pituicitos que são células com prolongamentos citoplásmicos abundantemente ramificados, cujo papel na neurohipófise é ainda mal definido.

As fibras nervosas, abundantes na parte posterior, terminam nos pituicitos, em vasos sanguíneos ou em canais intervasculares da neurohipófise mas nunca penetram na adenohipófise. Na parte anterior, as fibras são em menor número e algumas delas penetram na adenohipófise; nos teleósteos mais avançados verifica-se que existem terminações destas directamente nas células endócrinas.

2.2.3 Adenohipófise

A adenohipófise (AHP) é constituída essencialmente por células epiteliais diferenciadas que sintetizam, armazenam e libertam no sangue diferentes hormonas peptídicas. Nos teleósteos, as células secretoras agrupam-se por tipo, em zonas mais ou menos diferenciadas, o que de certo modo facilita a sua identificação neste grupo de animais (Moons *et al.*, 1989).

Nos teleósteos, a adenohipófise está dividida em duas partes (figura I.1): posteriormente a *pars intermedia* (que fica aplicada contra a neurohipófise) e anteriormente a *pars distalis* (que segrega a maior parte das hormonas) e que se encontra subdividida em *pars distalis proximal* (PPD) e *pars distalis rostral* (RPD), com base nos diferentes tipos de células que as formam: as corticotrópicas que segregam corticotrofina (ACTH), as células que segregam tirotrofina (TSH), as células de prolactina (PRL), as células gonadotrópicas que segregam gonadotrofina (GtH) e as somatotrópicas que segregam a hormona de crescimento (GH).

Células somatotrópicas - Na dourada, *Sparus aurata* (Quesada *et al.*, 1988) e em *Dicentrarchus labrax* (Cambré *et al.*, 1986) utilizando técnicas de coloração, estudos da ultraestrutura das células e reacções imunológicas com anticorpos específicos foi possível determinar que as células secretoras de GH localizam-se sobretudo na PPD da adenohipófise aparecendo isoladas no meio de células basófilas ou agrupadas ao longo das ramificações da *pars nervosa* (figura I.2). Naquela espécie foi observado um pequeno número de células secretoras de GH isoladas na *pars intermedia* da

adenohipófise, o mesmo ocorrendo na espécie *Oncorhynchus sp.* num estudo efectuado por Wagner e McKeown, 1983 e citado por Quesada *et al.*, 1988.

As células somatotrópicas quando activas apresentam um citoplasma granuloso, uma vez que a hormona é sintetizada intracelularmente de uma forma periódica e acumulada em grânulos, sendo a quantidade segregada apenas uma pequena parte do total armazenado. A actividade das células secretoras de GH é variável; em *Sparus aurata*, logo após a eclosão do ovo, a pituitária da larva possui células secretoras de GH cuja actividade vai rapidamente aumentando diariamente (Power e Canário, 1992). Na espécie *Pleuronectes platessa* as células secretoras de GH têm uma

actividade maior nos peixes jovens, imaturos e numa fase de crescimento rápido do que os peixes com as gónadas no último estado de maturação (Power, 1992). Variações sazonais da actividade das células secretoras de GH verificam-se em espécies com crescimento sazonal.

Células de prolactina - Regra geral só se encontram células secretoras de prolactina na *pars distalis* embora na truta e salmão fossem observadas algumas células dispersas na *pars intermedia* (Cambré *et al.*, 1986). As células de PRL constituem uma massa compacta na RPD (figura I.3) em espécies como, por exemplo, *Dicentrarchus labrax* (Cambré *et al.*, 1986), *Sparus aurata* (Power e Canário, 1992) e *Pleuronectes platessa* (Power, 1992).

Estudos anatómicos feitos em tilapia sugerem que o controlo hipotalâmico da PRL é feito através de fibras neurosecretórias que terminam na RPD e que têm origem no núcleo pré-óptico da região hipotalâmica rostral e no núcleo tuberal lateral da região hipotalâmica intermédia (Grau e Helms, 1990). Nas espécies mais avançadas de teleósteos as fibras nervosas da neurohipófise formam sinapses com as células de PRL; nas espécies mais primitivas as fibras da NHP não penetram naquelas células (*in* Chester-Jones *et al.*, 1987).

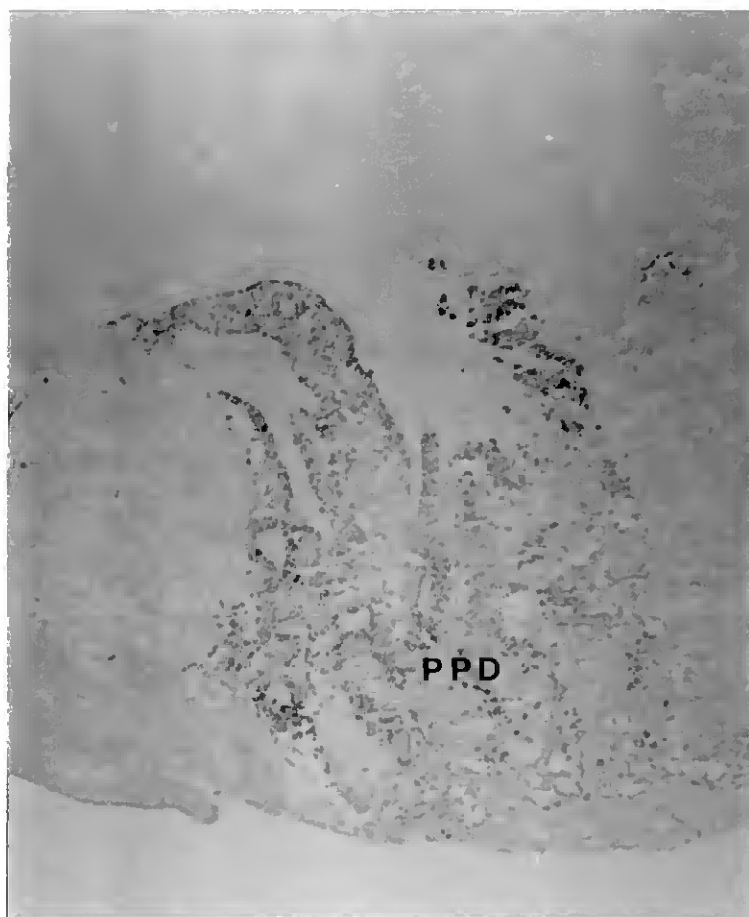


Figura I.2 (fotografia cedida por D. Power) - Corte longitudinal de parte de uma glândula pituitária de *Sparus aurata* L. com as células somatotrópicas, localizadas na *pars distalis proximal* (PPD), coradas pelo método da imunoperoxidase utilizando anti-GH da própria espécie.



Figura I.3 (fotografia cedida por D. Power) - Corte longitudinal da glândula pituitária de *Sparus aurata* L. com as células de prolactina, localizadas na *pars distalis rostral* (RPD), coradas pelo método da imunoperoxidase utilizando anti-PRL do salmão *Oncorhynchus kisutch*.

A relação da actividade das células de PRL com o ciclo sexual das espécies não está comprovada embora em alguns estudos pareça existir um decréscimo da actividade com a desova (Power, 1992). A relação com a função de osmoregulação da PRL parece ser mais evidente uma vez que, embora as células de prolactina estejam presentes quer nos teleósteos marinhos quer nos de água doce, é nestes que são muito mais abundantes (Power, 1992).

3. Hormona de Crescimento

A existência da hormona de crescimento (GH, somatotrofina) foi pela primeira vez demonstrada nos princípios de 1920 pela estimulação do crescimento observada em ratos tratados com extractos da glândula pituitária.

A hormona de crescimento pertence ao grupo das hormonas trópicas. Na maioria dos vertebrados, a GH é uma proteína com peso molecular de 21.000-23.000 daltons. Em todas as classes de vertebrados onde a hormona já foi isolada as moléculas (figura I.4) têm muitas características químicas comuns: duas pontes dissulfito, um alto conteúdo em leucina, uma única molécula de triptofano e um baixo conteúdo em metionina e histidina (Weatherley e Gill, 1987). Embora a estrutura primária da hormona seja relativamente variável, existem sequências homólogas sobretudo a localizada junto ao grupo terminal da cadeia -COOH.

Nos peixes, a molécula de GH foi purificada e caracterizada para diferentes espécies, como, por exemplo, o salmão *Oncorhynchus keta* (Wagner *et al.*, 1985), esturjão (Farmer *et al.*, 1980), carpa (Cook *et al.*, 1983; Miyajima *et al.*, 1988), salmão do Atlântico (Skibeli *et al.*, 1989), tilapia (Yamaguchi *et al.*, 1991), enguia (Kishida *et al.*, 1987; Yamaguchi *et al.*, 1987) e bacalhau do Atlântico (Rand-Weaver *et al.*, 1991). Nas espécies pertencentes à mesma ordem, as moléculas têm homologias de 82 a 100% mas são mais diversificadas entre ordens diferentes, onde se encontram homologias apenas da ordem de 49 a 68% (Chang *et al.*, 1992); por exemplo, na enguia *Anguilla japonica*, a molécula de GH tem maior homologia com as GHs das aves e dos mamíferos (55%) do que com a GH do salmão, com a qual existe apenas 46% de identidade (Yamaguchi *et al.*, 1987).

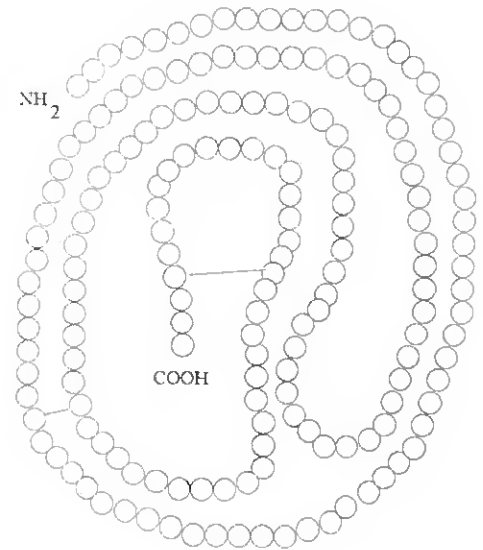


Figura 1.4 - Representação esquemática da molécula da hormona de crescimento de um mamífero, com indicação das duas pontes dissulfeto.

3.1 Acções da GH

A principal acção da GH é promover o crescimento do corpo aumentando o apetite e a eficiência na conversão do alimento. Os mecanismos pelos quais esta eficiência é aumentada não estão bem esclarecidos nos peixes mas é possível que sejam semelhantes aos das outras classes de vertebrados (Weatherley e Gill, 1987; *in* Chester-Jones *et al.*, 1987; Plisetskaya, 1990):

a) Efeitos directos da GH na síntese proteica, quer aumentando a permeabilidade celular aos aminoácidos, quer intracelularmente promovendo a incorporação destes em proteínas.

b) Efeitos indirectos da GH pela sua acção antagonista com os glicocorticóides (o que impede a gliconeogénese disponibilizando portanto maior quantidade de aminoácidos para a síntese proteica), pela sua acção antagonista com a insulina (cuja carência impede a formação de glicogénio permitindo uma maior disponibilidade de glicose que pode ser utilizada como fonte de energia) e pela sua acção potenciadora do glucagão (o qual promovendo a libertação de ácidos gordos das gorduras de reserva permitiria que os aminoácidos ingeridos ficassem mais disponíveis para a síntese proteica uma vez que os lípidos seriam preferencialmente utilizados como fonte de energia).

Nos teleósteos, é também já conhecida a acção tirotrópica da GH. Estudos efectuados, sobretudo em truta, parecem sugerir que a tiroxina (T_4), produzida pela tiróide, é transformada no fígado em triiodotironina (T_3) por acção do enzima 5'-monodeiodinase. O aumento da $V_{máx}$ do 5'D é induzido pela hormona de crescimento, embora factores como a temperatura, salinidade, cortisol, testosterona e quantidade de alimento tenham também grande influência naquele parâmetro (Eales, 1990; Kühn, 1990; Leatherland e Farbridge, 1992).

3.2 Controlo da secreção

Nos teleósteos, de uma maneira geral, as células de GH de pituitárias cultivadas *in vitro* aumentam a sua actividade nos primeiros dias de cultura, o que parece indicar a existência de um factor hipotalâmico inibidor. Mas há espécies em que as células de GH tornam-se hipoactivas em cultura, o que sugere ter havido a remoção de um factor hipotalâmico estimulador (Ball, 1981). O controlo da secreção e síntese de GH parece ser feito por factores estimuladores e inibidores, em que o equilíbrio entre os dois parece variar de espécie para espécie (Batten *et al.*, 1983).

Além do controlo por factores hipotalâmicos, há evidência de que outras hormonas, alguns peptídeos e até factores externos controlam a actividade das células somatotrópicas. A secreção e síntese de GH parece portanto ser regulada por mecanismos com uma complexa interacção e variáveis de espécie para espécie.

3.2.1 Secreção basal

Culturas *in vitro* de pituitárias de alguns teleósteos mostram que as células produtoras de GH podem ser moderadamente activadas, do que se pode concluir que nestes vertebrados aquelas células têm uma certa autonomia e não dependem exclusivamente da estimulação do hipotálamo para manter um certo nível de secreção de GH.

3.2.2 Controlo hipotalâmico da secreção de GH

A existência de dois factores hipotalâmicos com acções antagonistas sobre a secreção da hormona de crescimento é conhecida desde o fim de 1960. O primeiro a ser isolado e caracterizado quimicamente foi o factor inibidor denominado somatostatina (SRIF); o factor libertador da hormona de crescimento, GRF, apenas recentemente foi isolada e caracterizado quimicamente.

A hormona libertadora de tirotrófina (TRH) parece também controlar a secreção de GH.

Hormona libertadora da tirotrófina (TRH) - Pelo menos nos mamíferos, nas aves e em alguns répteis (Light e Denver, 1988), o tri-peptídeo TRH tem, como o nome indica, uma acção importante na regulação da hormona tirotrófina (TSH).

Mas este factor hipotalâmico parece ter também influência na secreção de GH. Embora a regulação da secreção de GH pela TRH em mamíferos ainda não esteja bem estabelecida, em juvenis de aves parece haver suficiente evidência de que a TRH tem um papel mais efectivo do que o GRF na estimulação da secreção de GH (Harvey *et al.*, 1988).

Nos peixes, a acção deste factor é pouco conhecido; estudos em *Anguilla anguilla* mostram que a secreção de GH por glândulas pituitárias desta espécie incubadas *in vitro* é estimulada pela presença de TRH (Hall *et al.*, 1986).

Factor inibidor da libertação da somatotrofina (SRIF) - O factor SRIF foi isolado, pela primeira vez, em 1973 em extractos do hipotálamo de ovinos (Brazeau *et*

al., 1973 citado por Plisetskaya *et al.*, 1986). Tem sido localizado imunocitoquimicamente nas células epiteliais gástricas e intestinais e no sistema nervoso de um grande número de animais (Conlon *et al.*, 1985).

Nos peixes, tem sido localizado imunocitoquimicamente no tracto digestivo, no pâncreas e na *pars distalis proximal* (Conlon *et al.*, 1985; Elbal *et al.*, 1986; Abad *et al.*, 1986; Adad *et al.*, 1990). Em algumas espécies as fibras nervosas SRIF-imunoreactivas penetram entre as células somatotrópicas (Moons *et al.*, 1988; Marchant *et al.*, 1989).

A somatostatina inibe fisiologicamente a secreção e a síntese de GH; foi isolada na lampreia *Anguilla anguilla*, no bacalhau *Gadus gadus* (Hall *et al.*, 1986) e no salmão *Oncorhynchus kisutch*. Nesta espécie, além da variante SS-14 (com 14 aminoácidos e uma ponte dissulfito entre as posições 3 e 14) foram isoladas mais duas formas de somatostatina (Plisetskaya *et al.*, 1986). Duma maneira geral, parece ter um efeito inibitório na secreção e síntese de GH (Fryer *et al.*, 1979; Ball, 1981; Cook *et al.*, 1984; Wigham *et al.*, 1984; Hall *et al.*, 1986; Helms *et al.*, 1987; Yada *et al.*, 1992).

Nos vários grupos animais donde foi extraída a somatostatina, além de haver uma grande homologia entre as moléculas, a actividade biológica e propriedades imunológicas são semelhantes. Isto sugere tratar-se de uma molécula muito antiga que possivelmente na origem tinha uma função inibidora nos neurónios e que mais tarde ficou especificamente envolvida na inibição da secreção da hormona de crescimento.

Factor libertador da hormona de crescimento (GRF) - A existência de GRF em extractos de hipotálamo é conhecida desde 1960, mas só recentemente foi isolada e caracterizada quimicamente. O GRF ovino e bovino tem 44 aminoácidos, sendo as posições 1 a 29 essenciais para a actividade biológica (*in* Chester-Jones *et al.*, 1987).

Nos teleósteos, foi identificado imunocitoquimicamente no hipotálamo e na pituitária (Pan *et al.*, 1985 citado por Hall *et al.*, 1986; Yada *et al.*, 1988). Em algumas espécies o GRF está localizado em fibras nervosas em estreita associação com as células de GH (Marivoet *et al.*, 1988; Moons *et al.*, 1988; Moons *et al.*, 1989).

Em todos os grupos, estudos *in vitro* parecem indicar ser o GRF um factor estimulador da secreção e síntese de GH, embora em algumas espécies de mamíferos e aves a acção só seja significativa quando os animais são anestesiados (Hall *et al.*, 1986; Harvey *et al.*, 1985) ou quando há uma inibição prévia da síntese com somatostatina, como acontece com a truta arco-íris (Yada *et al.*, 1992).

Relação SRIF-GRF - Em ratos, verifica-se uma interacção antagonista entre o SRIF e o GRF no controlo da secreção da hormona de crescimento, embora o mecanismo não esteja ainda esclarecido. Os resultados obtidos por Miki e Shizume (1986) indicam que quer o GRF quer o SRIF são segregados ritmicamente possivelmente sob controlo do sistema nervoso central. A libertação cíclica destes factores controla a segregação periódica de GH mas não interfere contudo com os níveis de base de GH.

Nos teleósteos, há alguma evidência de que estes dois factores têm acções opostas, mas o equilíbrio entre eles parece ser diferente de espécie para espécie (Ball, 1981). Por exemplo, na truta arco-íris a síntese de GH em pituitárias incubadas *in vitro* só é estimulada pelo GRF quando há uma inibição prévia da síntese com somatostatina (Yada *et al.*, 1992).

3.2.3 Outras hormonas

Nos mamíferos, verificou-se que as hormonas da tiróide e os glicocorticóides desempenham um papel importante na secreção da GH. Nos peixes, esta interacção é pouco conhecida; mas, por exemplo em *Oreochromis mossambicus*, não se verificou nenhum efeito estimulador da T₃ e T₄ na secreção de GH (Nishioka *et al.*, 1985).

A partir do fim de 1960 têm-se feitos bastantes estudos sobre o efeito das hormonas esteróides no crescimento dos peixes tendo-se concluído que, pelo menos em relação aos androgénios, estes aumentam a assimilação proteica, a digestibilidade aparente e a eficiência na utilização da energia, ou seja, parecem potenciar a acção da GH ou controlar a sua secreção. Em relação aos estrogénios, a não ser o estradiol que em experiências feitas com salmão se provou ter um efeito positivo no crescimento, nem todos têm uma acção anabólica (Weatherley e Gill, 1987).

O mecanismo pelo qual as hormonas sexuais interferem no crescimento não é conhecido nos peixes. No rato, os esteróides têm efeitos na secreção de GH via estimulação da transcrição do RNAm da galanina (Torsello *et al.*, 1992) e os androgénios aumentam a actividade da RNA polimerase e a entrada de 2-desoxiglicose no músculo (Weatherley e Gill, 1987).

3.2.4 Outros peptídeos

Para além dos factores hipotalâmicos envolvidos na inibição ou estimulação da GH tem-se conhecimento que existem peptídeos que modificam a secreção da hormona de crescimento pela pituitária. Um dos mais estudados na última década tem sido a galanina, neuropeptídeo com 29 aminoácidos, originalmente isolado do intestino delgado do porco.

Nos mamíferos, estudos imunocitoquímicos demonstraram que a galanina está amplamente distribuída no sistema nervoso central e periférico; em ratos foi detectada na parte anterior da glândula pituitária incluída em grânulos secretórios juntamente com a prolactina (Hyde *et al.*, 1991), no hipotálamo de ratos tratados com estrogéneos (Gabriel *et al.*, 1992) e em neurónios da medula-espinhal associados à motricidade dos músculos do esqueleto axial (Newton, 1993). Foi também detectada, duma maneira geral, confinada às células nervosas ou seus processos, no sistema reproductivo (Torsello *et al.*, 1992) e nos epitélios olfactivo e respiratório da mucosa nasal (Matsuda *et al.*, 1993) de ratos.

Nos mamíferos, diversas funções têm sido atribuídas a este neuropeptídeo: foi sugerido um papel importante na morfogénese e na neurogénese do sistema nervoso central (Elmqvist *et al.*, 1993), como medianeiro no efeito que o estrogéneo tem sobre o aumento das células lactotróficas e na estimulação da secreção de prolactina (Wynick *et al.*, 1993), como potente estimulador da secreção de GH *in vivo* (Hulting *et al.*, 1991) e de LHRH *in vitro* (Lopez *et al.*, 1990) e como indutor da contracção dos músculos lisos (Botella *et al.*, 1992).

Em alguns teleósteos, usando técnicas imunocitoquímicas, tem sido possível identificar a galanina (ou moléculas de estrutura muito próxima), no cérebro, na glândula pituitária e na medula-espinhal. Em *Dicentrarchus labrax*, fibras nervosas que coram com anti-galanina foram observadas em estreita associação com células de GH (Moons *et al.*, 1989), de prolactina (Moons *et al.*, 1991) e/ou células gonadotróficas (Batten *et al.*, 1990). Em alguns teleósteos parece existir uma sobreposição das áreas de

distribuição de galanina com as do factor libertador de corticotrofina (Batten *et al.*, 1990); já no salmão do Atlântico, as fibras nervosas imunoreactivas à galanina não são as mesmas da substância P, vasotocina e isotocina (Holmqvist e Ekström, 1991). Em *Poecilia latipinna* a galanina tem áreas de distribuição diferentes no macho e na fêmea (Cornbrooks e Parsons a), 1991). No salmão do Atlântico é conhecida a distribuição quantitativa dos receptores de galanina no cérebro (Holmqvist e Carlberg, 1992).

Embora o facto da existência de um peptídeo detectado em fibras nervosas em estreita associação com as células secretoras de hormonas da glândula pituitária não garanta que estas serão afectadas pela presença daquele (a célula pode não ter os receptores apropriados, enquanto que outra célula que os possua responde ao estímulo, mesmo que não esteja em contacto físico com a fibra nervosa libertadora do peptídeo), as áreas de distribuição da galanina sugerem a possibilidade de um papel fisiológico deste peptídeo no controlo da secreção e/ou síntese das hormonas da adenohipófise. O facto da relação fibras de galanina/células de GH ser mais evidente em espécies com elevada taxa de crescimento (Olivereau e Olivereau b), 1991), está de acordo com aquela possibilidade.

A diferença na distribuição de galanina entre machos e fêmeas de *Poecilia latipinna* sugere poder existir uma relação entre este peptídeo e o comportamento sexual, característico para cada sexo desta espécie (Cornbrooks e Parsons b), 1991). O aumento de imunoreactividade do tipo- galanina no cérebro de enguias tratadas *in vivo* com estradiol e com metil-testosterona, sugere existir uma possível influência da galanina no eixo pituitária-gónadas (Olivereau e Olivereau a), 1991).

3.2.5 Factores externos

Nos peixes, a acção da GH depende da temperatura ambiente; abaixo de um determinado valor deste factor a GH fica inactivada em animais hipofisectomizados, retomando a sua actividade logo que a temperatura atinge aquele valor (Weatherley e Gill, 1987).

Nos teleósteos eurialinos, os factores osmóticos parecem afectar a secreção da GH. Estudos realizados por Hall and Chadwick, 1978 e citados por Hall *et al.*, 1986 mostraram que quando as enguias passam de água doce para água salgada há uma inibição da secreção de GH cujo nível gradualmente vai aumentando até estabilizar ao fim de cerca de oito semanas. No entanto, quando comparadas com enguias de água doce, as glândulas pituitárias das enguias adaptadas ao mar segregam menos GH, respondem menos à estimulação hipotalâmica e possuem uma actividade menor de secreção de hormonas estimuladoras de GH.

O "stress" em truta (Pickering, 1990) pode causar uma temporária paragem no crescimento porque reduz a secreção de GH pela pituitária.

3.3 Sinergismo entre a GH e outras hormonas

Nas aves, a TRH parece potenciar a acção estimuladora exercida pelo GRF na secreção de GH (Perez *et al.*, 1987; Perez *et al.*, 1989).

Tratamentos de peixes com combinações de GH e tirotropina, bGH e hormona luteinizante ovina, GH e hormonas da tiróide e GH e hormonas esteróides têm mostrado que o sinergismo entre aquelas hormonas influencia o crescimento (Weatherley e Gill, 1987).

4. Prolactina

À descoberta, feita por Stricker e Grueter em 1928, de que a lactação era controlada pela pituitária, seguiram-se numerosos trabalhos que levaram há identificação da prolactina (*in* Clarke e Bern, 1980). A prolactina (PRL) pertence, tal como a hormona de crescimento, à família das hormonas trópicas, sendo no entanto muito mais versátil nas suas funções do que a GH.

Nos mamíferos, a PRL é um polipeptídeo de cadeia simples, com menos de 200 aminoácidos, tal como a hormona de crescimento, e com um peso molecular próximo do desta (*in* Clarke e Bern, 1980). Nos diferentes vertebrados as moléculas de GH e PRL têm um número de aminoácidos e peso molecular semelhantes, havendo uma homologia na sequência de aminoácidos de 20%-26%, o que lhes confere propriedades imunológicas próximas. A constância de identidades fortemente sugere um ancestral comum para a PRL e GH, hipótese que estudos comparativos recentes parecem confirmar, tendo sido proposta a existência de um gene ancestral comum, provavelmente num invertebrado (Kawauchi *et al.*, 1990).

Nos mamíferos, a molécula de PRL tem três pontes dissulfito (figura I.5) e duas moléculas de triptofano, mas as prolactinas isoladas e caracterizadas nos outros grupos de vertebrados têm apenas duas pontes dissulfito.

Nos peixes, já foi isolada e caracterizada em várias espécies: no salmão *Oncorhynchus keta* (Kawauchi *et al.*, 1983), no salmão *Oncorhynchus kisutch* (Grau *et al.*, 1984), na tilapia (Yasuda *et al.*, 1987), na carpa *Cyprinus carpio* (Miyajima *et al.*, 1988) e no salmão *Salmo salar* (Anderson *et al.*, 1989). Nestas espécies, a existência de duas pontes dissulfito e apenas uma molécula de triptofano, confere à PRL maior semelhança com a GH de qualquer grupo de vertebrados do que à PRL dos mamíferos (Miyajima *et al.*, 1988); uma comparação entre a composição em aminoácidos das moléculas de GH e de PRL, isoladas e caracterizadas para uma espécie de salmão, é feita na tabela I.1.

Em alguns teleósteos a existência de isoformas na mesma espécie tem sido confirmada por alguns estudos, sendo importante o caso da tilapia, uma vez

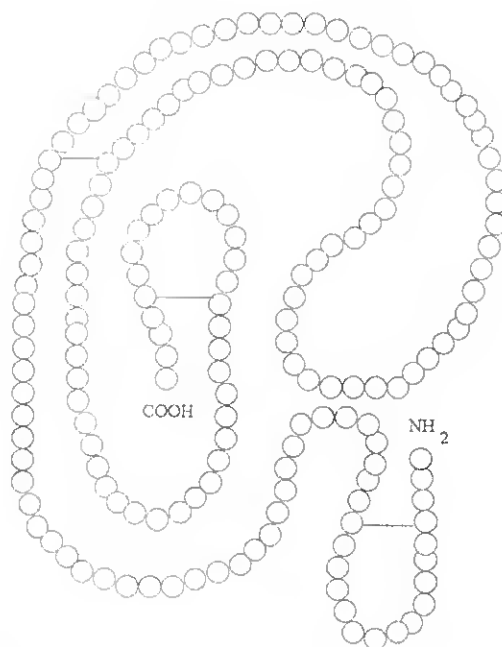


Figura I.5 - Representação esquemática da molécula da prolactina de um mamífero, com indicação das três pontes dissulfito.

Tabela I.1 - Composição em aminoácidos das moléculas de GH e PRL de "chum salmon".

	PRL a)	GH b)
Lis	9	12,6
His	5	4,2
Arg	7	8,6
Asp	16	28,0
Thr	9	6,8
Ser	26	11,7
Glu	17	22,5
Pro	13	3,7
Gli	9	7,3
Ala	6	6,6
Cis	4	3,3
Val	7	10,7
Met	9	2,7
Ile	10	10,6
Leu	26	28,5
Tir	2	6,8
Fen	7	6,8
Trp	1	1,0

a) *in* Chestes-Jonest *et al.*, 1987.

b) *in* Skibeli *et al.*, 1990.

que nesta espécie as moléculas são tão exageradamente divergentes que alguns autores sugerem que a duplicação ao nível genético foi há tempo suficiente para prever que estas isoformas tenham funções diferentes no animal (Specker *et al.*, 1993).

4.1 Acções da PRL

A principal acção da prolactina em teleósteos de água doce é a osmoregulação. Em peixes marinhos a PRL parece não ser tão importante. Os trabalhos feitos em *Fundulus heteroclitus* e *Poecilia latipinna* hipofisectomizados, cuja sobrevivência em água doce dependia de injeções de prolactina (que impedia o decréscimo de sódio no plasma), foram os primeiros que permitiram reconhecer na PRL esta importante acção fisiológica (Ball, 1969). Os mecanismos pelos quais a prolactina controla o fluxo de iões e água entre o meio exterior e o corpo do animal parecem ser de dois tipos:

(1) alterando a permeabilidade dos epitélios em todas as superfícies osmoregulatórias (brânquias, tegumento, boca e sistema urinário) de modo a manter o nível interno de Na^+ (*in* Chester-Jones *et al.*, 1987; Prunet *et al.*, 1990; Ball, 1969).

(2) participando no transporte activo dos iões por estimulação ou inibição da Na^+, K^+ -ATPase renal ou branquial (*in* Chester-Jones *et al.*, 1987).

Na reprodução dos peixes, a acção da prolactina parece estar sobretudo ligada ao comportamento parental (secreção de muco depois da desova para alimentar os filhos, desenvolvimento da bolsa para protecção dos filhos em *Hippocampus*, cuidados maternos em alguns ciclídeos). No entanto para além destas funções relacionadas com o comportamento parental existem outras, como por exemplo em *Gillichthys mirabilis*, em que a administração de PRL a peixes hipofisectomizados e castrados permite que estes mantenham as vesículas seminais (Clarke e Bern, 1980; *in* Chester-Jones *et al.*, 1987; Ball, 1969). A acção da PRL na reprodução parece compreender dois mecanismos: (1) actuando em sinergismo com outras hormonas sexuais (Clarke e Bern, 1980) ou (2) estimulando a génese de esteróides, como sucede nos salmonídeos em que a prolactina potencia a acção das gonadotropinas na estimulação da produção do E_2 e do 17-20-P (Prunet *et al.*, 1990) ou como na tilápia, em que a PRL estimula a produção de testosterona pelo tecido testicular (Rubin e Specker, 1992).

As propriedades somatotrópicas da PRL são conhecidas em alguns grupos de vertebrados. Embora pouco estudadas nos peixes, estudos feitos com juvenis de salmão indicam que a PRL estimula o crescimento embora sendo menos activa do que a GH (Weatherley e Gill, 1987); efeitos no metabolismo dos lípidos foram encontrados em alguns teleósteos (*in* Chester-Jones *et al.*, 1987).

Efeitos como a influência da PRL na melanogénese em *Fundulus heteroclitus* carecem de mais investigação noutras espécies para ser possível fazer generalizações (Ball, 1969).

4.2 Controlo da secreção

O facto das células de PRL em cultura continuarem a sintetizar e/ou segregar a hormona para o meio de cultura sugere que, quando em contacto com o hipotálamo, estão sujeitas a um mecanismo inibidor. Embora o controlo da secreção e síntese de PRL por factores hipotalâmicos seja feito essencialmente por um mecanismo inibitório,

há alguma evidência sobre a existência de um factor estimulador da secreção de PRL (Clarke e Bern, 1980; Ball, 1981; Batten *et al.*, 1983; Barry e Grau, 1986).

A osmolaridade e concentração iónica do meio ambiente parecem exercer uma grande influência na secreção e síntese de PRL de alguns peixes eurialinos (Baker *et al.*, 1975; *in* Chester-Jones *et al.*, 1987; Wigham *et al.*, 1977; Batten *et al.*, 1983). No entanto, em salmões adultos da espécie *Oncorhynchus keta*, a hipotonicidade do meio parece não ter efeito sobre a secreção de PRL (Suzuki *et al.*, 1987); estudos recentes em truta arco-íris parecem mostrar que nesta espécie eurihalina as células de PRL também não são sensíveis à pressão osmótica do meio (Gonnet *et al.*, 1988). Nos peixes marinhos são praticamente inexistentes os estudos sobre a influência da osmolaridade do meio sobre a secreção de PRL, mas parece não ter o importante significado que tem para algumas das espécies eurihalinas.

A influência de outras hormonas, particularmente as sexuais, alguns neurotransmissores e factores externos na actividade das células de PRL, tem também vindo a ser demonstrada.

4.2.1 Secreção basal

Duma forma geral as células de PRL nos teleósteos têm secreção autónoma permanecendo activas quando separadas do hipotálamo. No entanto, em algumas espécies (enguia, peixe dourado e truta arco-íris) quando autotransplantadas para meios hipertónicos as células ficam inactivas e atrofiam, indicando que nestas espécies existe uma inibição tónica da secreção basal (*in* Chester-Jones *et al.*, 1987).

4.2.2 Controlo hipotalâmico

Nos peixes o controlo hipotalâmico principal parece ser feito por um mecanismo inibidor, ou seja, a prolactina só é libertada quando os inibidores são desactivados (Clarke e Bern, 1980; Ball, 1981). Há evidência de que, além de um factor hipotalâmico inibidor da PRL, existe um factor estimulador desta hormona (Fiorindo *et al.*, 1981; Wigham *et al.*, 1984; *in* Chester-Jones *et al.*, 1987).

Dopamina (DA) - Em água salgada, a dopamina é um importante inibidor da secreção de PRL mas parece não interferir sobre a sua síntese (Grau e Helms, 1990; *in* Chester-Jones *et al.*, 1987). Em água doce, o aumento de libertação de PRL mostra que a dopamina é desactivada, indicando que o estímulo osmótico se sobrepõe a este factor hipotalâmico (Clarke e Bern, 1980).

Somatostatina (SS) - Na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), têm sido obtidos resultados contraditórios: para alguns autores a somatostatina não tem um efeito inibidor significativo na síntese de PRL (Le Goff *et al.*, 1992) nem qualquer efeito sobre a secreção de PRL para o meio de cultura (Yada *et al.*, 1992). Outros autores verificaram que a somatostatina inibe a libertação de PRL naquela espécie (Le Goff *et al.*, 1992; Williams e Wigham, 1992).

Na tilápia, a somatostatina é um poderoso inibidor da PRL; estudos imunocitoquímicos nesta espécie mostram que uma imunofluorescência SRIF-ir ocorre em axónios que emanam do hipotálamo e terminam entre as células de PRL na RPD (Grau e Helms, 1990). Experiências *in vitro* parecem mostrar que o mecanismo pelo

qual a somatostatina inibe a secreção de PRL é através da redução da produção de AMPc e do bloqueio da acção do Ca^{2+} cujo aumento é induzido pela redução da pressão osmótica do meio (Grau e Helms, 1990).

Hormona libertadora de tirotrófina (TRH) - A TRH parece ser um importante factor estimulador da secreção de PRL nos mamíferos, aves, répteis e anfíbios (Ball, 1981; Hall *et al.*, 1986).

Nos peixes, embora pareça estar presente no hipotálamo de alguns teleósteos, tem-se obtido resultados contraditórios nos estudos sobre o efeito fisiológico da TRH na secreção de PRL. Por exemplo, em tilapia, a TRH estimula a secreção de PRL desde que haja uma preincubação das células com estradiol (Barry *et al.*, 1986; Barry *et al.*, 1990; Grau e Helms, 1990) mas na truta arco-íris, a TRH tem um efeito inibitório sobre a secreção de PRL estimulada pelo 17β - estradiol (Williams *et al.*, 1992).

Estudos *in vitro* em tilapia indicam-no como factor inibidor cuja desactivação é induzida pela baixa tonicidade do meio (Wigham *et al.*, 1977).

4.2.3 Outras hormonas

A relação hormonas esterólicas-PRL foi estudada em algumas espécies parecendo não ser possível nos teleósteos fazer uma generalização desta interacção.

17β -estradiol (E_2) e $17\alpha,20\beta$ diidroxiprogesterona (17-20-P) - Estudos feitos em *Gillichthys mirabilis* e em *Sarotherodon mossambicus* mostram que o 17β -estradiol parece estimular a secreção de PRL quer directamente quer permitindo uma acção estimuladora da TRH, a qual promove a secreção de PRL (Grau e Helms, 1990).

Na truta, os resultados são contraditórios uma vez que num caso o 17β -estradiol parece não ter qualquer efeito sobre a prolactina enquanto que o 17-20-P provoca um decréscimo de prolactina no plasma (Prunet *et al.*, 1990) mas noutro caso a secreção de PRL é estimulada pelo tratamento com 17β -estradiol (Williams e Wigham, 1992).

Cortisol - Em tilapia, o cortisol inibe a secreção de prolactina *in vitro*, sendo a resposta dependente da dose e tempo de exposição. O mecanismo de inibição parece ser também, como na SRIF e no VIP, através do bloqueio dos sistemas do AMPc e do ião cálcio (Grau e Helms, 1990).

Estudos efectuados em salmonídeos pareciam indicar que o cortisol não desempenhava um papel importante no controlo da secreção da prolactina ou se o tinha seria oposto ao que se verifica na tilapia, ou seja, estimularia a secreção de PRL (Prunet *et al.*, 1990). Estudos mais recentes parecem contudo indicar que o cortisol tem um efeito inibidor na secreção de prolactina (Pottinger *et al.*, 1992).

4.2.4 Outros peptídeos

Na tilapia, o peptídeo vasoactivador do intestino (VIP) é um forte inibidor da secreção de PRL parecendo actuar, tal como o SRIF, através de um mecanismo bloqueador dos sistemas mensageiros do AMPc e do ião cálcio (Grau e Helms, 1990).

Em *Dicentrarchus labrax*, fibras nervosas que coram com anti-galanina parecem terminar directamente nas células de PRL, sugerindo a possibilidade de um papel fisiológico deste peptídeo no controlo da secreção de PRL (Moons *et al.*, 1989).

4.2.5 Factores externos

Nos teleósteos eurialinos a pressão osmótica externa tem um efeito directo na secreção de prolactina. A secreção de PRL varia inversamente com a pressão osmótica, sendo o Na^+ o principal ião envolvido (Clarke e Bern, 1980).

Estudos em tilapia mostram que os catiões do meio ambiente Ca^{2+} e Mg^{2+} e também o pH têm efeitos sobre a secreção de PRL. Assim uma baixa actividade das células libertadoras de PRL está associada a elevados níveis de Ca^{2+} e Mg^{2+} no ambiente. Em relação ao pH, águas acidificadas estimulam a secreção de PRL desde que o meio não seja isotónico (Bonga *et al.*, 1988; Grau e Helms, 1990).

Sobre o efeito do "stress" provocado pelo confinamento dos peixes ou pela baixa qualidade da água há pouca informação e contraditória. Experiências feitas com juvenis de salmão parecem sugerir que o "stress" estimula a secreção de prolactina (Prunet *et al.*, 1990) mas em truta arco-íris peixes em "stress" provocado por aqueles factores têm baixos níveis de prolactina no plasma (Pottinger *et al.*, 1992).

O efeito do fotoperíodo sobre a secreção de PRL foi verificado em alguns peixes (Clarke e Bern, 1980).

4.3 Sinergismo entre a PRL e outras hormonas

A principal sinergia entre a prolactina e outras hormonas é com as hormonas sexuais. Por exemplo, nas aves, o pré-tratamento com estrogéneos não só estimula a secreção basal de PRL como aumenta a sensibilidade da pituitária ao efeito estimulador da TRH (Hall *et al.*, 1986); efeitos semelhantes foram observados em tilapia (Barry *et al.*, 1986).

Em algumas espécies de teleósteos, o ritmo diário de sensibilidade à PRL é sincronizado com o ritmo diário de concentração de corticosteróides no plasma; além do sinergismo temporal com corticosteróides, em *Gillichthys mirabilis* a PRL sinergiza com o propionato de testosterona (éster sintético da testosterona) para que as vesículas seminais, em peixes hipofisectomizados e castrados, se mantenham (Clarke e Bern, 1980).

Por outro lado, a PRL potencia a acção de outras hormonas. No salmão, a PRL actua em sinergismo com as gonadotropinas na produção do E_2 e do 17-20-P (Prunet *et al.*, 1990).

5. Receptores membranários das hormonas

É característico das hormonas desencadearem uma resposta plena nas células alvo, com concentrações extremamente pequenas. As células alvo conseguem ser

sensíveis, discriminar e responder às hormonas, porque elas possuem moléculas receptoras que são capazes de se ligar especificamente a estas hormonas e iniciar uma resposta ao nível molecular da célula. Os receptores das hormonas peptídicas encontram-se na plasmamembrana mais externa das células alvo. A interacção das hormonas com os receptores membranários leva à produção do AMP cíclico a partir do ATP, por acção de uma enzima, a adenilciclase ligada à membrana. A ligação da hormona ao seu receptor, no lado externo da membrana, leva à produção aumentada do AMP cíclico no interior da membrana.

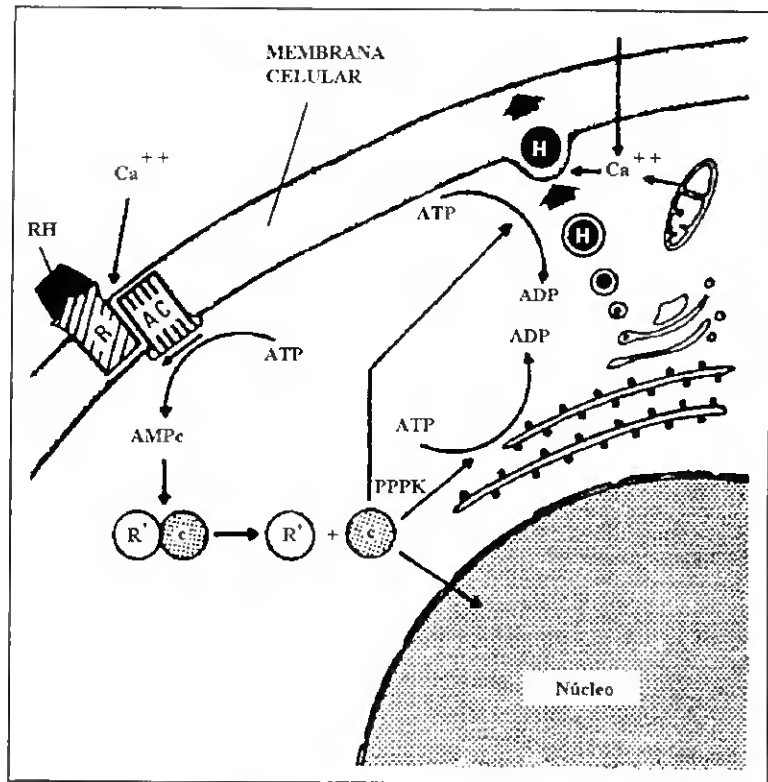


Figura I.6 (reproduzida de Chester-Jones *et al.*, 1987) - Esquema do mecanismo bioquímico que se desenvolve intracelularmente após a estimulação da secreção da GH ou da PRL: R, receptor de RH na membrana celular; H, hormona de crescimento ou prolactina; AC, adenilciclase; ADP, adenosina-5'-difosfato; ATP, adenosina-5'-trifosfato; AMPc, adenosina-5'-monofosfato cíclica; PPK, cinases das proteínas.

Assim a hormona não entra na célula, e em seu lugar o AMPc desempenha o papel de mensageiro dentro da célula. O papel principal do AMPc é o de activar as cinases das proteínas, de cuja acção depende a libertação da PRL e da GH das células (figura I.6).

O aumento da concentração de AMPc depende da concentração do ião cálcio, cujo aumento é feito por influxo ou por mobilização do Ca^{2+} armazenado intracelularmente (Hall *et al.*, 1986; Dias Correia e Dias Correia, 1985).

6. Mecanismo de retrocontrolo

Estudos feitos em mamíferos (Weatherley and Gill, 1987; *in* Chester-Jones *et al.*, 1987; Hall *et al.*, 1986; Dias Correia e Dias Correia, 1985) permitiram concluir que a regulação da secreção da hormona de crescimento faz-se por mecanismos de retrocontrolo (positivos, se estimulam a secreção da hormona ou negativos, se a inibem). Naqueles vertebrados são conhecidos três sistemas de retrocontrolo: longo, curto e ultracurto:

O *sistema longo* consiste no retrocontrolo feito pelas somatomedinas, libertadas pelo fígado sob acção da GH. Quando é atingido um nível elevado de somatomedinas no sangue a secreção de GH pela pituitária é inibida, sendo retomada logo que aquele nível começa a descer. Aparentemente a somatomedina C actua estimulando a secreção do SRIF. No *sistema curto*, a GH pode suprimir a sua própria secreção ao nível da

pituitária ou actuando sobre os factores hipotalâmicos. No *sistema ultracurto*, os factores hipotalâmicos regulam a sua própria segregação.

Nos peixes não é conhecido o mecanismo de retrocontrolo da GH; tem sido sugerido que é possível que seja semelhante ao dos outros grupos de vertebrados embora até à data não se tenham isolado somatomedinas em nenhum teleósteo (*in* Chester-Jones *et al.*, 1987). Mas o factor de crescimento-I semelhante à insulina (IGF-I), exerce um retrocontrolo negativo sobre a secreção de GH, na truta; a expressão do DNAc do IGF-I no fígado de *Oncorhynchus kisutch* é estimulada pelo tratamento com GH (Yada *et al.*, 1992).

Em relação à PRL tem sido sugerido que esta hormona afecta alguns mecanismos do cérebro, envolvidos na regulação da sua própria secreção. A identificação de receptores de PRL em diferentes regiões do cérebro e do hipotálamo de alguns mamíferos e aves, parecem confirmar esta hipótese (Muccioli *et al.*, 1988).

7. Objectivos do presente trabalho

A dourada europeia (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758), muito frequente no Mediterrâneo e na zona temperada do Atlântico Oriental, é uma espécie tipicamente litoral. Parte do seu ciclo de vida decorre nas águas salobras de estuários e lagunas costeiras; durante o Inverno migra para profundidades maiores, estando esta migração provavelmente relacionada com a postura. No Mediterrâneo, a época de postura começa em Novembro e prolonga-se até Janeiro. A dourada é uma espécie com hermafroditismo protândrico - depois dos dois anos de idade dá-se a maturação sexual dos testículos; aos três anos há uma inversão sexual, ocorrendo a maturação dos ovários nesta idade (*in* Morales, 1983).

A dourada é um peixe muito apreciado na maioria dos países mediterrânicos; na última década, tem-se verificado nestes países um desenvolvimento muito grande do cultivo desta espécie. Os factores que mais têm contribuído para este desenvolvimento são: (1) o elevado valor comercial da espécie *Sparus aurata* L., (2) a sua capacidade de se adaptar a variações de temperatura e salinidade e (3) a sua elevada taxa de crescimento - a espécie tem um crescimento rápido, podendo atingir o tamanho comercial de 200 a 400 gr. num período de 1 a 2 anos de cultivo em tanques (Pitt *et al.*, 1977).

O rápido crescimento da espécie cria um particular interesse nos estudos relacionados com o controlo endócrino deste aspecto da fisiologia da espécie. A hormona de crescimento (GH) e a prolactina (PRL), libertadas pela glândula pituitária, regulam de um modo fundamental vários processos fisiológicos, particularmente o crescimento (Ball, 1981; Hall *et al.*, 1986; *in* Chester Jones *et al.*, 1987). A síntese e a secreção destas duas hormonas é regulada por vários factores, incluindo um número elevado de diferentes peptídeos; a cultura de glândulas pituitárias *in vitro* é uma das técnicas mais utilizadas para se obter informação sobre o papel fisiológico daqueles neurotransmissores.

Foi objectivo do presente trabalho estudar o efeito de alguns peptídeos sobre a actividade das células de prolactina e das células somatotrópicas de glândulas pituitárias, de *Sparus aurata* L., cultivadas *in vitro*.

PARTE II - MATERIAL E MÉTODOS

As douradas (*Sparus aurata* L.) utilizadas no presente trabalho foram obtidas em empresas comerciais de cultivo desta espécie, uma localizada em Olhão, com tanques com 1ha de área e 1,5m de profundidade, e outra em Espanha. Qualquer das empresas fornecedoras criam esta espécie em regime semi-intensivo, com renovação diária dos tanques com água do mar e em condições de luz e temperatura naturais.

1. Incubação de pituitárias *in vitro*

A colheita e posterior incubação das pituitárias foram sempre realizadas em condições de assépsia.

As pituitárias de *Sparus aurata* L. foram obtidas por decapitação de peixes vivos ou mortos recentemente e imediatamente transferidas para o meio de cultura para pré-incubação, hipotónico em relação ao plasma do animal (Tabela II.1).

Tabela II.1 - Formulário dos meios de cultura

<p>1. Meio de cultura para a pré-incubação</p> <p>- Solução de Krebs bicarbonatada (145 mM/l de Na e 3,8 mM/l de Ca):</p> <p>7,35 ml de NaCl com uma concentração de 54,7 g/l 0,21 ml de KCl com uma concentração de 8,185 g/100 ml 0,6 ml de CaCl₂ com uma concentração de 6,05 g/100 ml 0,2 ml de KH₂PO₄ com uma concentração de 5,275 g/100 ml 0,2 ml de MgSO₄ com uma concentração de 9,55 g/100 ml 6,93 ml de NaHCO₃ com uma concentração de 2,60 g/100ml</p> <p>Perfazer o volume até 65 ml com água destilada, adicionar 0,13 g de glucose, saturar a solução com O₂ e acertar o pH para 7,8.</p> <p>- Meio de pré-incubação:</p> <p>9,6 ml de solução de Krebs bicarbonatada 0,2 ml de uma mistura de aminoácidos essenciais 0,1 ml de vitaminas 0,1 ml de uma mistura de aminoácidos não-essenciais 0,0006 g de penicilina 200 µl de glutamina</p> <p>Esterilizar com filtro Millipore (0,22 µ)</p> <p>2. Meio de cultura para a incubação</p> <p>- Adicionar L-[4,5-³H] leucina ao meio de cultura de pré-incubação de modo a obter uma concentração de 1,5 µl de ³H-leucina/ml (solução-mãe de ³H-leucina com uma actividade específica de 120-190 Ci/mole)</p> <p>- Diluir, com o meio de cultura marcado, quantidades variáveis das soluções-mãe das diferentes drogas, de acordo com a experiência a efectuar e a dosagem a testar para cada droga.</p>
--

No fim da amostragem as pituitárias eram transferidas para placas de cultura multicompartimentadas, com uma pituitária em cada compartimento, ao qual era

adicionados 25 µl do meio de cultura para a pré-incubação. Nos compartimentos das margens da placa foram colocados ± 30 µl de água destilada esterilizada, que permite manter um determinado grau de humidade dentro da placa, impedindo a evaporação do meio de cultura dos outros compartimentos durante a incubação das pituitárias.

Após uma pré-incubação de 24 horas em estufa a 20°C, o meio era retirado e guardado no congelador a uma temperatura de -20°C. A cada compartimento da placa de cultura eram adicionados 25 µl do meio de cultura para incubação (tabela 1), cuja composição era variável consoante os tratamentos que se pretendia fazer.

A incubação era feita em estufa a 20°C durante 48 horas; após este período, os meios de cultura eram recolhidos, devidamente referenciados e conservados em congelador a - 20°C. As pituitárias, mantidas na placa compartimentada, eram também conservadas em congelador a - 20°C.

2. Extracção

Os extractos das pituitárias, obtidos pelo procedimento descrito na Tabela II.2, eram imediatamente analisados ou conservados a - 20°C para posterior análise.

Tabela II. 2 - Obtenção dos extractos das pituitárias

- A uma temperatura de 4°C, esmagar a pituitária com pilão de vidro em 50 µl de tampão TRIS - base 0,05 M com pH de 8,6 ajustado com HCl.
- Após o esmagamento, aguardar 30 - 45 minutos a 4°C.
- Centrifugar 5 minutos a 12000 RPM e retirar o sobrenadante, que deve ser conservado a - 20°C se não se utilizar de imediato.

3. Determinação espectrofotométrica da proteína total

O doseamento da proteína total em amostras de meio de cultura ou de extractos das pituitárias foi feito por uma modificação do método de Lowry (Lowry *et al.*). Neste método, o desenvolvimento duma cor azulada em soluções de proteína é feito em duas etapas sucessivas: (1) reacção da proteína com o cobre em meio alcalino, e (2) redução do reagente de Folin pela proteína tratada com o cobre. Como a redução do reagente de Folin é feita com libertação de ácido fosfórico, para se desenvolver o máximo de cor é necessário que a solução seja bem tamponizada. Verificou-se que uma mistura de Na₂CO₃ e de NaOH que mantivessem o pH próximo de 10 permite um maior desenvolvimento da cor.

A cor desenvolvida é portanto proporcional à concentração de proteína embora a relação não seja linear. Na Tabela II.3 descreve-se o procedimento para a determinação da concentração de proteínas por aquele método.

Tabela II. 3 - Método de Lowry

Reagentes

- A - solução de 2% de Na₂CO₃ em NaOH 0,1 N
- B - solução de 0,5% de CuSO₄, 5H₂O em citrato de sódio a 1%
- C - 1ml de B + 50 ml de A (preparado imediatamente antes de cada análise)
- D - Reagente de Folin diluído de 1/2 em água destilada

Tabela II. 3 (cont.)

Preparação das soluções padrão (em duplicado)	
Solução de BSA em NaOH 0,1 N (1 mg/ml)	NaOH 0,1 N
Volume em μ l	Volume em μ l
0	100
10	90
20	80
30	70
40	60
50	50
60	40
70	30
80	20
90	10
100	0

Preparação das amostras para doseamento
50 μ l do meio de cultura ou do extracto de pituitária + 50 μ l de NaOH 0,1 N

Reacção colorimétrica
A 100 μ l do padrão ou da amostra adicionar sucessivamente:
1 ml de C, misturar de imediato no "vortex" e aguardar 10 minutos
100 μ l de D, misturar de imediato no "vortex" e aguardar 30 minutos a 90 minutos

Leitura em espectrofotómetro a 750 nm

Com base na curva padrão foram determinadas as concentrações de proteína nas amostras a partir dos valores de absorvância lidos em espectrofotómetro.

4. Separação e detecção das hormonas por electroforese

As hormonas dos meios de cultura e dos extractos das pituitárias foram separadas por electroforese em gel de acrilamida, técnica que consiste no movimento das proteínas quando submetidas a um campo eléctrico, utilizando como suporte um gel de acrilamida polimerizada segundo o método descrito por Laemmli (Hames, 1981; Carvalho, 1985; See and Jackowski, 1989).

A molécula de acrilamida, quando em presença de uma substância iniciadora, como por exemplo o persulfato de amónio, forma um radical livre. O radical livre de uma molécula reage com outras moléculas e numa série de reacções, catalizadas pela tetrametiletenodiamina (TEMED), formam-se longas cadeias contendo radicais livres. A solução resultante é muito viscosa mas não forma um gel sendo para isso necessário adicionar metileno-bis-acrilamida antes da polimerização ocorrer. A bis-acrilamida causa a formação de pontes laterais entre as cadeias de acrilamida formando-se um gel, muito estável e que serve de suporte para a electroforese.

O tanque do aparelho de electroforese contém uma solução electrolítica que conduz a corrente eléctrica; no gel é incorporado outro tampão que além de manter o pH constante serve de electrólito conduzindo a corrente nos locais sem proteína.

A hormona de crescimento e a prolactina foram separadas por SDS-PAGE (SDS-PoliAcrilamida Gel Electroforese) e estimados os seus pesos moleculares aparentes pela relação entre R_f e $\log(\text{peso molecular})$ de padrões apropriados. Na técnica SDS-PAGE, as amostras são tratadas térmicamente com 2-mercaptoetanol (agente redutor, responsável pela quebra das ligações dissulfito), dodecilsulfato de sódio

(SDS) e sacarose; esta é utilizada para aumentar a densidade da amostra, evitando que esta flutue durante a aplicação. Os dois primeiros tratamentos permitem que as proteínas fiquem com estrutura primária de tal modo que, quando o SDS as separa e lhes confere carga negativa, os complexos SDS-polipeptídeos tenham aproximadamente a mesma forma. Um grande número de polipeptídeos reduzidos ligam-se ao SDS na base do peso (1,4g SDS/g de polipeptídeo). Análises de viscosidade parecem indicar que os complexos SDS-polipeptídeo reduzido formam estruturas em forma de bastonete (modelo com que nem todos os autores estão de acordo), com comprimentos proporcionais ao peso molecular dos polipeptídeos. A mobilidade electroforética destes complexos apenas é proporcional ao peso molecular do polipeptídeo se as razões carga/massa e a forma de todos os complexos forem idênticas.

No presente trabalho, a técnica SDS-PAGE foi aplicada num sistema de placas de gel. A Tabela II.4.1 inclui o equipamento, material e procedimento utilizados.

Tabela II. 4.1 - SDS-PAGE (método de Laemmli)

<p>1. Equipamento</p> <p>1.1 Aparelho de electroforese (ATTO Corporation, Japão): Especificações: Aplicação - electroforese em gel vertical. Tamanho do gel - 90 mm de largura × 80 mm de altura × 1 mm de espessura. Nº de alvéolos do pente de aplicação das amostras - 14. Volume do tanque - 340 ml. Material - Plástico acrílico, excepto platina para os eléctrodos, vidro para os moldes do gel, borracha de silicone para os vedantes e Teflon para os pentes. Dimensões - 16 cm de largura × 14.4 cm de altura × 8,6 cm de espessura. Peso - 1,1 kg.</p> <p>Peças do conjunto: Tanque de electroforese (1) Tampa com tomadas incorporadas para os eléctrodos (1) Cabos de ligação à fonte de energia (2) Vidros com espessamentos para moldar o gel (2) Vidros sem espessamentos para moldar o gel (2) Vedantes (2) Pentes (2) Molas de metal (8)</p> <p>1.2 Fonte de energia</p> <p>1.3 Microseringas de 50 µl com ponta em bisel.</p> <p>1.4 Bomba de vácuo ligada a uma torneira do laboratório.</p> <p>2. Soluções stock</p> <p>Stock de acrilamida/bisacrilamida a 30%: Dissolver 29,1 g de acrilamida e 0,9 g de bisacrilamida (BDH 2811) em água destilada num volume total de 100 ml. A solução deve ser conservada a 4°C e por um período máximo de 1-2 meses se se pretende reproductibilidade dos dados, uma vez que a acrilamida quando armazenada por um período mais longo hidroliza originando ácido acrílico e amónia.</p> <p>Solução de SDS (10%, p/v): Dissolver 10 g de SDS em água destilada num volume total de 100 ml. A solução é estável à temperatura ambiente durante várias semanas, só podendo ser utilizada se estiver límpida e incolor.</p> <p>N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamina (TEMED)</p>
--

Tabela II.4.1 (cont.)

Persulfato de amónio (10%, p/v):

Dissolver 1 g de persulfato de amónio (SIGMA A-9164) em água destilada num volume total de 10 ml.

A solução é estável apenas durante dois dias.

Tampão Tris - HCl 1,5 M (pH 8,6)

Tampão Tris - HCl 0,5 M (pH 6,8)

Tampão da amostra:

Dissolver 8 g de sacarose e 0,004 g de azul de bromofenol em cerca de 18 ml de Tris - HCl 0,125 M (pH 6,8).

Adicionar 1,2 g de SDS e deixar dissolver sem agitação.

Perfazer um volume de 18,8 ml com Tris - HCl 0,125 M (pH 6,8).

Tampão dos eléctrodos:

Dissolver 36,03 g de glicina e 7,57 g de Tris em água destilada num volume total de 250 ml.

3. Preparação das amostras e da mistura padrão

Tomar amostras de 10 µl e adicionar igual volume de tampão da amostra. Ferver em banho-maria durante 2 minutos e deixar arrefecer até à temperatura ambiente antes de fazer a aplicação.

Tratar do mesmo modo que as amostras um padrão constituído por uma mistura de proteínas de peso molecular conhecido.

4. Electroforese das proteínas

4.1 Preparação do molde:

Limpar os vidros, colocar o vedante e ajustar os dois vidros com as molas. O gel de separação é pipetado entre os dois vidros do molde.

4.2 Gel de separação (12,5 % de acrilamida):

7,5 ml da solução de acrilamida/bisacrilamida (29,1: 0,9)

4,46 ml de Tris 1,5 M pH 8,6

5,86 ml de água destilada

Desgasificar com bomba de vácuo durante 20 minutos

180 µl de solução de SDS a 10%

10 µl de TEMED

70 µl de solução de persulfato de amónio a 10%

Pipetar entre os dois vidros do molde até cerca de 1 cm do topo; aguardar uns minutos e preencher o espaço com água destilada.

Aguardar até que o gel polimerize o que se torna visível pela separação do gel e água.

Aspirar a água, secar com papel de filtro e verter o gel de concentração.

4.3 Gel de concentração:

0,9 ml da solução de acrilamida/bisacrilamida (29,1: 0,9)

1,45 ml de Tris 0,5 M pH 6,8

3,6 ml de água destilada

Desgasificar com bomba de vácuo durante 5 minutos

60 µl de solução de SDS a 10%

10 µl de TEMED

18 µl de solução de persulfato de amónio a 10%

Verter cuidadosamente o gel entre os dois vidros do molde, colocar o pente e aguardar que polimerize.

Retirar o pente e lavar os alvéolos com água destilada retirando-a com uma microseringa.

Retirar os vedantes dos moldes.

Tabela II. 4.1 (cont.)

4.4 Montagem do aparelho:

Solução A - Dissolver 30 ml de tampão dos eléctrodos em 270 ml de água destilada e adicionar 3 ml de SDS (10%).

Encher as cavidades laterais do tanque de electroforese com solução A.

Colocar os moldes com os geis no tanque e encher a cavidade central deste com a solução A.

Aplicar, com microseringa, as amostras e o padrão nos alvéolos dos geis.

4.5 Separação das proteínas:

A separação é feita fazendo passar pelo gel uma corrente constante (20 mA / gel) até a frente atingir cerca de 1 cm da base do gel (1 hora e 40 minutos a 2 horas).

A coloração das bandas correspondentes às diferentes proteínas separadas por SDS-PAGE é feita com Coomassie-Azul durante 12 horas com agitação. O gel é posteriormente imerso numa solução descorante durante o tempo necessário para que as bandas fiquem com uma cor que tenha um bom contraste com o fundo (o formulário das soluções utilizadas está incluído na Tabela II.4.2).

Tabela II.4.2 - Soluções utilizadas para a coloração das bandas pelo método do Coomassie-Azul

1. Coomassie-R 250 azul

Dissolver 0,55 g de Coomassie azul num litro de metanol. Adicionar 1 litro de água destilada e 200 ml de ácido acético.

2. Solução descorante

Adicionar a 150 ml de ácido acético 100 ml de metanol. Perfazer um volume de 2 litros com água destilada.

Para concentrações de proteína inferiores a 0,2-0,5 µg utilizou-se a coloração com nitrato de prata, método mais sensível do que o anterior, que se baseia na produção de átomos de prata, a partir de sais de prata, por determinados grupos existentes nas proteínas. O método descrito na Tabela II.4.3 (Johnstone *et al.*, 1987) pode ser usado depois da coloração com Coomassie, quando se verifica que a quantidade de proteína/banda é muito pequena, perdendo sensibilidade o método de coloração pelo Coomassie-Azul.

Tabela II.4.3 - Coloração com nitrato de prata

Material:

Solução de metanol, quimicamente puro, a 50% (v/v)

Solução de nitrato de prata (preparado de fresco): 0,8 g dissolvido em 4 ml de água

Hidróxido de amónio 14,8 M

Hidróxido de sódio a 0,36%

Solução de ácido cítrico a 1% (p/v)

Solução de formaldeído a 38% (p/v)

Solução de metanol a 45% (v/v) e 5 % de ácido acético (v/v)

Procedimento:

-Agitar o gel em solução de metanol a 50%. Mudar de hora a hora por 3 vezes e deixar, com agitação, durante a noite.

Tabela II.4.3 (cont.)

<p>-Imediatamente antes de usar, preparar a seguinte solução: 21 ml de hidróxido de sódio com 1,4 ml de hidróxido de amónio. Juntar, gota a gota, a solução de nitrato de prata, ao mesmo tempo que se agita fortemente a solução. Perfazer até 100 ml com água.</p> <p>-Adicionar ao gel e agitar durante 15 minutos. -Lavar o gel, durante 30 minutos, com água, fazendo 3-4 mudanças. Lavagem no agitador. -Imediatamente antes de usar, preparar a seguinte solução: 2,5 ml de ácido cítrico com 0,25 ml de formaldeído e perfazer com água até 500 ml. -Desenvolver a cor no gel com agitação (cerca de 10 minutos) -Quando as bandas começam a aparecer lavar imediatamente com água e juntar rapidamente a seguinte solução: 45% metanol (v/v), 5 % ácido acético (v/v) -Conservar o gel no escuro dentro desta solução.</p> <p>Notas importantes: Utilizar água destilada e filtrada por Millipore. Utilizar recipientes para a coloração absolutamente limpos.</p>

5. "Western blotting"

As hormonas dos meios de cultura ou dos extractos de pituitárias, separadas por SDS-PAGE, foram transferidas electroforéticamente do gel *sem coloração* para membranas nitrocelulósicas segundo o método descrito por Scheidtmann (1989) e incluído na Tabela II.5.1. No fim da transferência o gel foi corado em Coomassie-Azul para controlo da eficácia da transferência.

Tabela II.5.1 - Transferência electroforética das hormonas

<p>1. Equipamento</p> <p>1.1 Aparelho de transferência (Atto Corporation, Japão): Especificações: Distância entre eléctrodos - até 45 mm Material - plástico acrílico, excepto grafite para os eléctrodos Dimensões - 24 × 24 × 16 cm Peso - 2,5 kg, aprox.</p> <p>Peças do conjunto: Caixa com um eléctrodo na base Tampa com eléctrodo no interior Cabos de ligação à fonte de energia Papel de nitrocelulose Papel de filtro</p> <p>1.2 Fonte de energia</p> <p>2. Tampão de transferência Dissolver 6,05 g de Tris e 7,195 g de glicina em água destilada num volume total de 400 ml. Perfazer 500 ml com metanol.</p> <p>3. Procedimento Retirar o gel do molde logo após terminada a electroforese e mergulhar no tampão de transferência durante cerca de 10 minutos.</p>

Tabela II.5.1 (cont.)

- Utilizando luvas, cortar a membrana e o papel de filtro com o tamanho apropriado.
- Passar a membrana por água destilada e mergulhar no tampão de transferência.
- Deixar que 6-8 folhas de papel de filtro fiquem embebidas por capilaridade com o tampão de transferência, colocar na base do aparelho e pressionar para retirar as bolhas de ar que eventualmente se tenham formado.
- Colocar sobre este conjunto de folhas de papel a membrana e sobre esta o gel. Nesta operação o gel deve ser logo colocado na posição final uma vez que qualquer contacto entre o gel e a membrana resulta na transferência imediata das proteínas do gel para a membrana.
- Sobre o conjunto papel-gel-membrana colocar 6-8 folhas de papel de filtro embebidas em tampão de transferência e pressionar para retirar bolhas de ar.
- Colocar a tampa do aparelho, apertar bem e fazer passar uma corrente com uma amperagem igual a $0,8 \times \text{área em cm}^2$ das folhas de papel durante uma noite.

A identificação imunológica da GH e PRL foi feita incubando as hormonas transferidas para a membrana com anticorpos primários específicos de cada hormona que se pretende identificar; é feita uma segunda incubação com um anticorpo secundário, dirigido ao anticorpo primário e ligado covalentemente a uma enzima. A cor desenvolvida pela reacção da enzima com a solução de coloração indica a posição da hormona (Scheidtmann, 1989).

Na Tabela II.5.2 descreve-se o procedimento utilizado na identificação imunológica da hormona de crescimento e da prolactina, representado gráficamente na figura II.6.1.

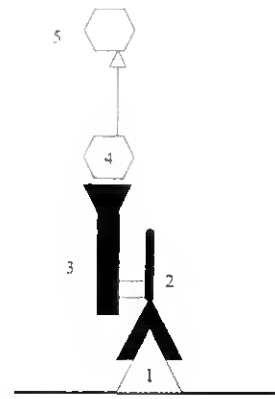


Figura II.6.1 - Diagrama da identificação imunológica da hormona de crescimento e da prolactina. 1) Antígeno. 2) Anticorpo primário. 3) Anticorpo secundário. 4) Peroxidase/antiperoxidase. 5) Precipitado de cor azul resultante do 4-cloro, 1-naftol, em presença da peroxidase.

Tabela II.5.2- Identificação imunológica da GH e da PRL.

1. Desmontar o aparelho de transferência e incubar a membrana numa solução de 0,1% de TWEEN 20 (v/v) e 2% de leite magro liofilizado (p/v) em Tris 0,1 M pH 7,6 durante no mínimo 3 horas. Esta solução bloqueia a superfície da membrana contra possíveis ligações não-específicas.
2. Lavar (4×3 minutos) em Tris 0,1 M pH 7,6.
3. Incubar durante a noite com agitação numa mistura de α -dourada GH #73 (1/200) e #74 (1/150) para identificação da hormona de crescimento ou em α -salmão PRL #91 (1/100) para identificação da prolactina.
4. Lavar (4×5 minutos) na solução TWEEN 20/leite.
5. Lavar (2×2 minutos) em Tris 0,1 M pH 7,6.
6. Incubar durante 1 hora com agitação em anti-IgG-PAP (1/3000).
7. Lavar (4×5 minutos) em Tris 0,1 M pH 7,6.
8. Desenvolver a cor azul que identifica a hormona utilizando a seguinte solução (preparada imediatamente antes da reacção):
 - 19 ml de Tris 0,1 M pH 7,6 fresco
 - 15 mg de 4-cloro, 1-naftol
 - 1 ml de metanol

6. Quantificação da GH e PRL

As hormonas sintetizadas pelas pituitárias incubadas *in vitro* podem ser radioactivas, desde que ao meio de cultura se adicione um amino-ácido essencial marcado.

Depois da separação das hormonas por SDS-PAGE, as bandas correspondentes à GH e PRL, marcadas com L-[4,5- H_3]-leucina, foram cortadas com lâmina apropriada, as hormonas eluidas do gel e as radiações emitidas pelo isótopo medidas em espectrómetro (procedimento descrito na Tabela II.6). O método baseia-se no facto da desintegração do núcleo do isótopo radioactivo ser feita com emissão de radiações; parte da energia cinética destas é transferida para um líquido cintilador, o qual converte em fotões a energia emitida pela radiação. O número de fotões produzidos por uma partícula da radiação é portanto proporcional à sua energia cinética. O detector do espectrómetro é constituído por um ou dois tubos fotomultiplicadores; o cátodo fotoemissivo do tubo fotomultiplicador emite electrões após radiação, os quais vão ser "acelerados" para o ânodo pela aplicação de um potencial entre os eléctrodos. O número de impulsos eléctricos, que é portanto proporcional à energia das partículas emitidas pela amostra radioactiva, é acumulado num analisador durante o tempo de leitura da amostra. A taxa de desintegração do núcleo é assim medida em cpm, ou seja, número de impulsos eléctricos por minuto.

Tabela II.6 - Quantificação da GH e PRL radioactivas

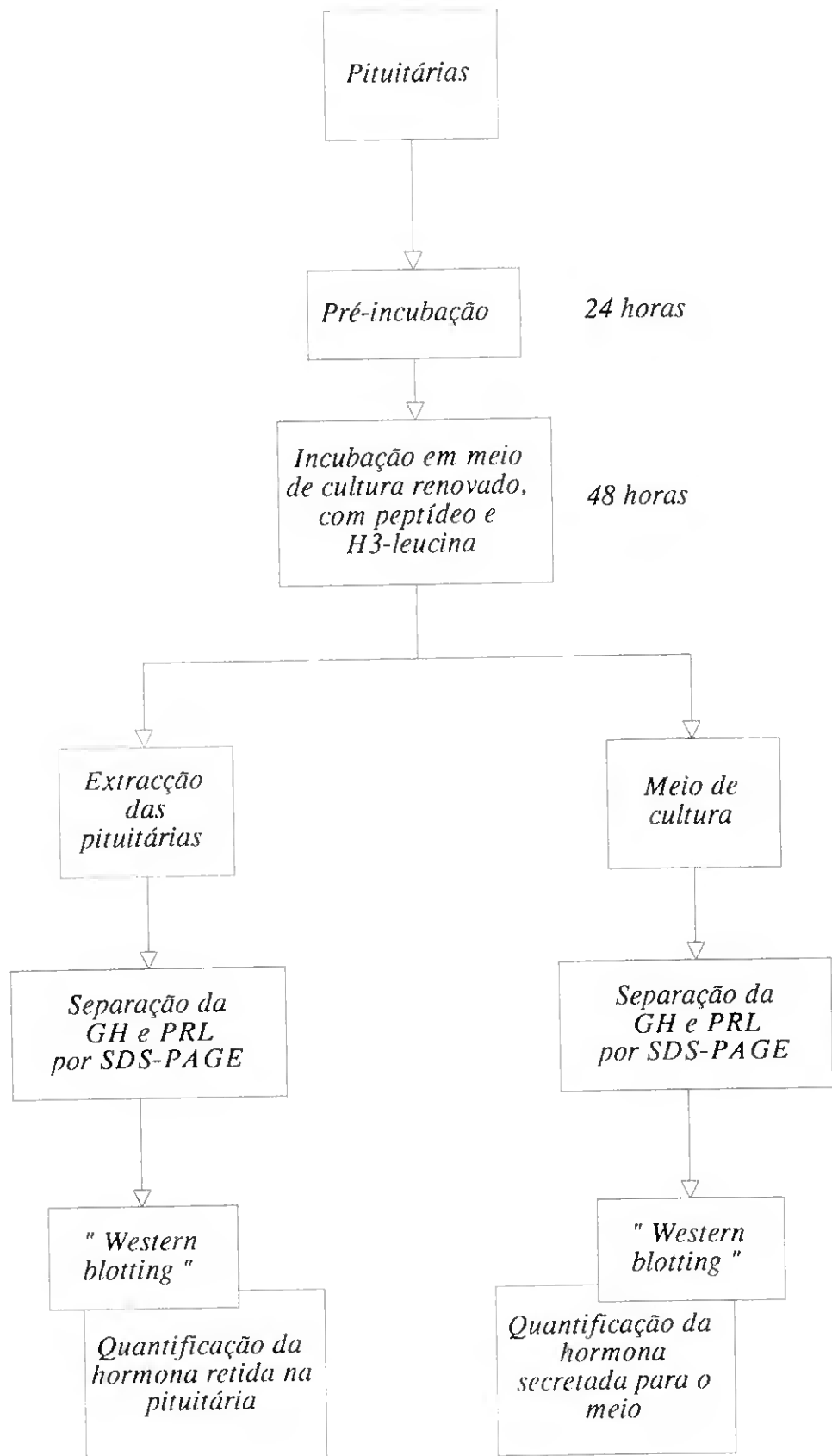
Eluição das hormonas das tiras do gel:

1. Num "Bio-Vial" colocar a tira de gel e adicionar 100 μ l de H_2O_2 puríss. p. a.
2. Incubar a 50°C durante cerca de 24 horas, até completa solubilização do gel.

Quantificação da hormona radioactiva:

1. A cada frasco, devidamente arrefecido até atingir a temperatura ambiente, adicionar 4 ml de líquido de cintilação Optiphase "HiSafe - cocktail for aqueous and non-aqueous samples" (Fisons Chemicals, Inglaterra).
3. Fazer as contagens em espectrómetro Beckman LS 6000 IC, de modo a que cada amostra seja contada durante 5 minutos. Em cada série de amostras utilizar como referência a contagem de 25 μ l de meio com 1,5 μ l de L-[4,5- H_3]-leucina/ml (solução-mãe com actividade específica de 120-190 Ci/mole).

Fluxograma das etapas de cada experiência



7. Plano de Amostragem

7.1 Determinação da quantidade total de proteína libertada para o meio de cultura

Em duas experiências fez-se a incubação em estufa a 20°C de quinze e vinte pituitárias, durante seis e sete dias respectivamente, utilizando o meio de pré-incubação descrito anteriormente. Os meios de cultura eram renovados diariamente, e, no fim da experiência, recolhidos e conservados em congelador a -20°C.

Em cada amostra recolhida foi estimada a quantidade de proteína total pelo método de Lowry.

7.2 Experiências sobre o efeito de diferentes drogas em pituitárias incubadas *in vitro*

As pituitárias de *Sparus aurata* L. foram pré-incubadas durante 24 horas e incubadas durante 48 horas em meio de incubação com ³H-leucina, pela técnica descrita anteriormente. Ao meio de cultura foram adicionadas diferentes drogas com o objectivo de estudar o efeito destas sobre a actividade das células de GH e PRL. No fim do período de incubação os meios de cultura e os extractos das pituitárias eram imediatamente sujeitos a electroforese ou conservados em congelador a -20°C para posterior análise. A identificação das bandas correspondentes à GH e PRL foi feita por "Western blotting", técnica repetida sempre que a solução-mãe de acrilamida-bisacrilamida era renovada. A quantificação da GH e PRL radioactivas, sintetizadas *de novo* e libertadas para o meio de cultura ou retidas nas pituitárias, foi feita pela técnica descrita anteriormente.

Nas diferentes experiências efectuadas (Tabela II.7) as concentrações das soluções-mãe de SS-14, GRF e galanina utilizadas foram, respectivamente, 4 mg/ml, 0,1 mg/ml e 0,1 mg/ml.

Tabela II.7 - Plano de Amostragem

Experiências sobre o efeito da somatostatina e galanina	
<i>Junho/93</i>	
Grupo 1 (n = 12) - galanina	3 µg/ml
Grupo 2 (n = 12) - galanina	2 µg/ml
Grupo 3 (n = 12) - galanina	0,4 µg/ml
Grupo 4 (n = 12) - SS-14	80 µg/ml
Grupo 5 (n = 12) - SS-14	40 µg/ml
Grupo 6 (n = 12) - SS-14	8 µg/ml
Grupo 7 (n = 12) - sem tratamento	(controlo)
<i>Fevereiro/94</i>	
Grupo 1 (n = 10) - galanina	0,4 µg/ml
Grupo 2 (n = 10) - galanina	2 µg/ml
Grupo 3 (n = 10) - galanina	4 µg/ml
Grupo 4 (n = 10) - galanina	6 µg/ml
Grupo 5 (n = 10) - SS-14	8 µg/ml
Grupo 6 (n = 10) - SS-14	40 µg/ml
Grupo 7 (n = 10) - SS-14	80 µg/ml
Grupo 8 (n = 10) - galanina (2 µg/ml) + SS-14	(8 µg/ml)
Grupo 9 (n = 10) - galanina (2 µg/ml) + GRF	(2 µg/ml)
Grupo 10 (n = 10) - sem tratamento	(controlo)

Tabela II.7 (cont.)

<i>Agosto/94</i>	
Grupo 1 (n = 10) - SS-14 0,5 µg/ml	
Grupo 2 (n = 10) - sem tratamento (controle)	
Experiências sobre o efeito do GRF e galanina + GRF	
<i>Julho/93</i>	
Grupo 1 (n =12) - galanina (3 µg/ml) + GRF (1 µg/ml)	
Grupo 2 (n =12) - galanina (3 µg/ml) + GRF (3 µg/ml)	
Grupo 3 (n =12) - galanina (3 µg/ml) + GRF (7 µg/ml)	
Grupo 4 (n =12) - GRF (1 µg/ml)	
Grupo 5 (n =12) - GRF (7 µg/ml)	
Grupo 6 (n =12) - GRF (14 µg/ml)	
Grupo 7 (n =12) - sem tratamento (controle)	
Experiências sobre o efeito da galanina em peixes alimentados com ração tratada com 17β-estradiol	
<i>Agosto/93</i>	
Grupo 1 - peixes alimentados com 2 mg de E ₂ /kg de ração	
subgrupo 1.1 (n = 3) - galanina (2 µg/ml)	
subgrupo 1.2 (n = 3) - controle	
Grupo 2 - peixes alimentados com 15 mg de E ₂ /kg de ração	
subgrupo 2.1 (n = 3) - galanina (2 µg/ml)	
subgrupo 2.2 (n = 3) - controle	
Grupo 3 - peixes alimentados com ração sem E ₂	
subgrupo 3.1 (n = 3) - galanina (2 µg/ml)	
subgrupo 3.2 (n = 3) - controle	
<i>Janeiro/94</i>	
Grupo 1 - peixes alimentados com 5 mg de E ₂ /kg de ração	
subgrupo 1.1 (n = 6) - galanina (2 µg/ml)	
subgrupo 1.2 (n = 6) - controle	
Grupo 2 - peixes alimentados com ração sem E ₂	
subgrupo 2.1 (n = 8) - galanina (2 µg/ml)	
subgrupo 2.2 (n = 8) - controle	

8. Análise estatística

Em cada banda a quantidade de hormona sintetizada *de novo* é expressa em cpms. A partir da leitura/banda foram estimados o total de hormona em 25 µl de meio de cultura utilizado em cada compartimento da placa e o total de hormona em 50 µl da solução utilizada na extração de cada pituitária.

Para cada tratamento foi calculada a média e o erro padrão do total de hormona libertada/pituitária para o meio de cultura e do total de hormona retida residualmente/pituitária. Diferenças significativas entre tratamentos foram detectadas utilizando o teste-t para a diferença entre médias, a dois níveis de significância ($\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$).

A quantidade total de GH e PRL, sintetizadas *de novo* durante a incubação, foram obtidas por adição da quantidade hormona secretada para o meio de cultura e da quantidade residualmente retida na pituitária. O desvio padrão desta média foi calculado ponderando os erros padrão das quantidades de hormona secretada e retida residualmente na pituitária.

PARTE III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização da GH e PRL de *Sparus aurata L.*

Separação e identificação

Em todas as amostragens as pituitárias foram incubadas em meio de pré-

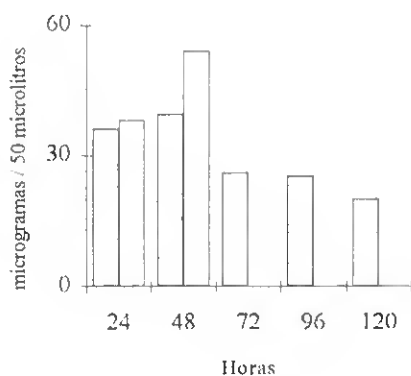


Figura III.1 - Quantidade de proteína total secretada diariamente para o meio de cultura durante 2 dias de incubação (barras brancas) e 5 dias de incubação (barras sombreadas).

incubação durante 24 horas. Ao fim deste período o meio era renovado, adicionada ^3H -leucina e as drogas cujo efeito na secreção e síntese de GH e PRL se pretendia analisar. Os tratamentos tiveram sempre a duração de 48 horas porque a análise quantitativa de proteína no meio, ao longo de sete dias de incubação (figura III.1), mostrou ser este o período em que maior quantidade de proteína era secretada para o meio de cultura. Cerca 50% do total de proteína secretada para o meio de cultura é constituída por GH e PRL (figura III.2); estudos da ultraestrutura das células de GH e de PRL, em pituitárias de *Poecillia latipinna* incubadas *in vitro*, mostram que a actividade de secreção

daquelas células aumenta entre as 18 horas e os 3 dias de incubação, período a partir do qual se dá um aumento da actividade de síntese (Batten *et al.*, 1983).

As hormonas, do meio de cultura e dos extractos das pituitárias, foram separadas por SDS-PAGE em gel descontinuo. A melhor separação das bandas de PRL e GH foi obtida utilizando uma solução-mãe de acrilamida-bisacrilamida a 30% e uma concentração final de acrilamida-bisacrilamida no gel de separação de 12,5%.

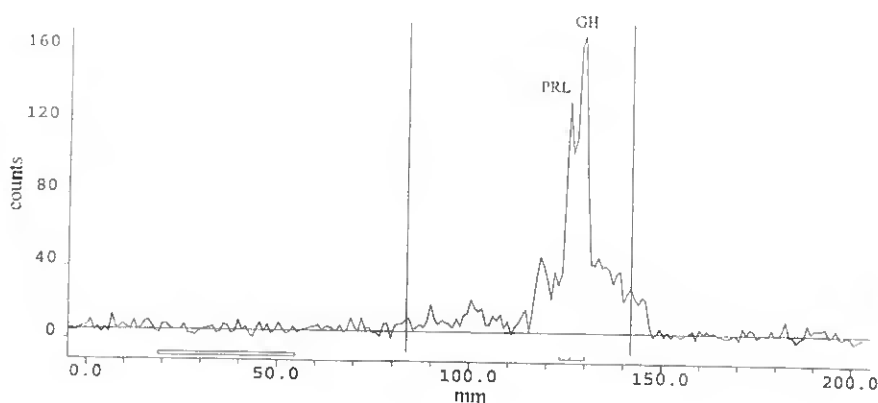


Figura III.2 - Contagem das radiações emitidas pela ^3H -leucina existente nas bandas proteicas, por varrimento do gel com um detector BIOSCAN ligado ao sistema de cromatografia RaChel.

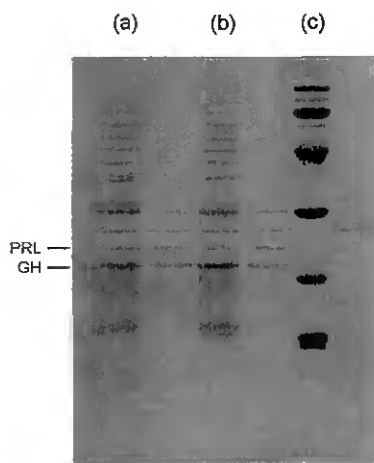


Figura III.3 - Separação da GH e PRL por SDS-PAGE em placa de gel. Sistema descontínuo, com uma concentração de 12,5% de acrilamida no gel de separação e coloração das bandas com Coomassie-Azul R250. (a) Extracto de pituitária (b) Meio de cultura (c) Padrões de peso molecular conhecido.

de cultura e de extractos de pituitárias (Figura III.3). Nestas condições, como o \log_{10} dos pesos moleculares dos marcadores está correlacionada linearmente com a sua mobilidade relativa (R_f), é possível construir uma curva padrão e, a partir desta, estimar os pesos moleculares dos polipeptídeos resultantes da desnaturação a quente e na presença de SDS e de 2-mercaptoetanol das hormonas GH e PRL de *Sparus aurata* L. (figura III.5)

Os valores de R_f , utilizados para a estimação dos pesos moleculares aparentes da GH e da PRL, foram calculados utilizando a seguinte fórmula (See *et al.*, 1990):

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela proteína}}{\text{distância da frente}} \times \frac{\text{comprimento do gel antes da coloração}}{\text{comp. do gel depois da descoloração}}$$

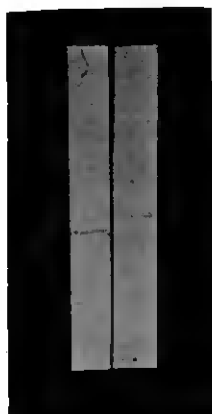


Figura III.4 - Análise por "western blotting" da GH e PRL depois de separadas por SDS-PAGE.

A separação entre as duas bandas foi de $3 \pm 0,5$ mm, sendo a amplitude do intervalo essencialmente dependente do tempo em que decorreu a electroforese (figura III.3).

A identificação da GH e da PRL nas amostras foi feita por "western blotting", utilizando anticorpos específicos contra a GH e PRL de *Sparus aurata* e de *Oncorhynchus keta* respectivamente; o sinal mais forte e persistente foi obtido quando se mudou várias vezes a solução bloqueadora da superfície da membrana e quando a incubação com o anticorpo primário foi feita pelo menos durante 12 horas (figura III.4).

Estimativas dos pesos moleculares

Para estimar os pesos moleculares da GH e PRL foi feita a separação electroforética, no mesmo gel, de uma mistura de polipeptídeos de peso molecular conhecido e de amostras de meio

de cultura e de extractos de pituitárias (Figura III.3). Nestas condições, como o \log_{10} dos pesos moleculares dos marcadores está correlacionada linearmente com a sua mobilidade relativa (R_f), é possível construir uma curva padrão e, a partir desta, estimar os pesos moleculares dos polipeptídeos resultantes da desnaturação a quente e na presença de SDS e de 2-mercaptoetanol das hormonas GH e PRL de *Sparus aurata* L. (figura III.5)

Para a GH foi estimado um peso molecular aparente de 23.800 daltons, valor próximo dos 23.500 estimados para o salmão *Oncorhynchus keta* (Wagner *et al.*, 1985) e para o esturjão (Farmer *et al.*, 1980), mas superior ao encontrado na bibliografia para outras espécies de teleósteos: entre 22.500 e 23.000 daltons para a carpa (Cook *et al.*, 1983; Miyajima *et al.*, 1988), 23.000 para o salmão do Atlântico (Skibeli *et al.*, 1989), 20.000 para a tilapia (Yamaguchi *et al.*, 1991), 23.000 para a enguia (Kishida M. *et al.*, 1987) e duas variantes, com 20.000 e 22.000 daltons, para o bacalhau do Atlântico (Rand-Weaver *et al.*, 1991).

Para a PRL foi estimado um peso molecular aparente de 26.600 daltons, muito superior ao valor de 23.500 daltons, estimado para o salmão *Salmo salar* (Anderson *et al.*, 1989), de 22.300 para o salmão

Oncorhynchus keta (Kawauchi *et al.*, 1983), de 22.500 para o salmão *Oncorhynchus tshawytscha* (Prunet *et al.*, 1984), de 22.000 para o salmão *Oncorhynchus kisutch* (Grau *et al.*, 1984) ou de 23.000 para a carpa e de 24.000 daltons para uma das variantes da PRL da tilapia (Yasuda *et al.*, 1987).

No presente trabalho, os valores estimados para os pesos moleculares da GH e da PRL são muito elevados em relação aos descritos na bibliografia e necessitam portanto de confirmação posterior. No entanto, a diferença encontrada com os valores dos outros autores pode ser resultado da diferença entre os métodos utilizados ou pode ter origem no grau de diversidade biológica e imunológica que aparentemente existe entre as GHs dos teleósteos (Wagner *et al.*, 1985). Comparações entre a PRL da carpa e duas variantes da tilapia mostram uma diferença significativa na sequência de aminoácidos sugerindo a existência de uma diversidade nas PRLs dos teleósteos (Yasuda *et al.*, 1987).

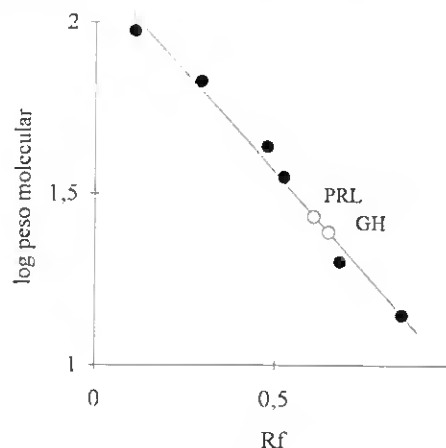


Figura III.5 - Curva de calibração \log_{10} peso molecular versus R_f , para SDS-PAGE em placa de gel descontínuo. Pesos moleculares dos marcadores - 94.000, 67.000, 43.000, 35.200, 20.000 e 14.000 daltons. As marcas brancas indicam as estimativas do peso molecular da PRL (26.600 daltons) e da GH (23.800 daltons).

Variações sazonais na síntese de GH e PRL

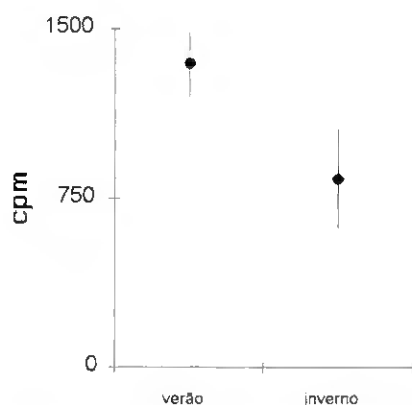


Figura III.6 - Variação sazonal de ^3H -GH apresentada como média \pm erro padrão dos valores obtidos nas experiências efectuadas em Junho, Julho e Agosto/93 (Verão) e Janeiro e Fevereiro/94 (Inverno).

Embora não exista uma diferença significativa (para $\alpha = 0,05$) entre as médias de GH sintetizada durante as incubações efectuadas no Inverno e no Verão, parece haver uma tendência para a síntese *in vitro* desta hormona ser menor no Inverno do que no Verão (figura III.6). Uma tendência semelhante foi observada para a PRL (figura III.7), embora as médias dos dois períodos do ano também não sejam significativamente diferentes para o mesmo nível de significância testado para a GH.

Dado que as incubações foram feitas sempre a temperatura controlada (20°C), os dados obtidos parecem indicar haver uma diferença sazonal na actividade das pituitárias, provavelmente ligada a alterações fisiológicas dos animais durante o período da reprodução, que se estende nesta espécie

entre Abril-Maio de um ano e Janeiro-Fevereiro do ano seguinte.

Embora esta variação sazonal não se encontre citada na bibliografia em relação ao grupo dos peixes, estudos em aves mostram que a concentração de GH no plasma tem uma variação sazonal, com um padrão monofásico em que os valores máximos são

atingidos no Verão (Scanes *et al.*, 1980). Também nas aves o nível de PRL no plasma tem uma nítida variação sazonal com um aumento gradual durante a ovulação atingindo um pico quando se inicia a incubação dos ovos e os cuidados parentais (Burke *et al.*, 1980). Uma variação sazonal do nível de PRL no plasma e na pituitária foi também descrita para o sapo *Bufo japonicus*, com os valores mais elevados durante a época da criação (Ishii S. *et al.*, 1989).

Os valores incluídos no gráfico da figura III.6 representam cerca de 14% do total sintetizado de GH (Funkenstein *et al.*, 1991; Chester-Jones *et al.*, 1987; Skibeli *et al.*, 1989) e de cerca de 9% do total sintetizado de PRL (Bun *et al.*, 1980). Fazendo a conversão dos valores obtidos para a síntese total verifica-se que, durante o Verão, o nível de PRL é 2-3 vezes superior ao de GH sintetizada, enquanto que durante o Inverno os valores não são significativamente diferentes. É provável que a diferença encontrada esteja relacionada com alterações fisiológicas dos animais durante o ciclo reprodutor.

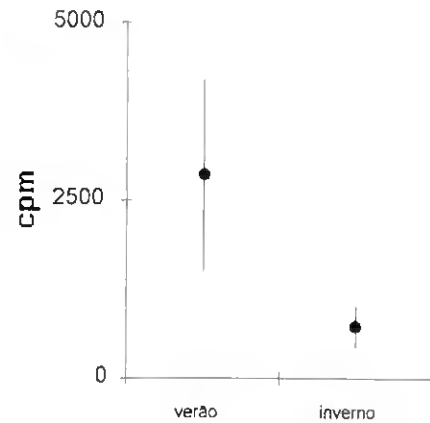


Figura III.7 - Variação sazonal de ^3H -PRL apresentada como média \pm erro padrão dos valores obtidos nas experiências efectuadas em Junho, Julho e Agosto/93 (Verão) e Janeiro e Fevereiro/94 (Inverno).

2. Controlo sobre a síntese e secreção de GH em pituitárias incubadas *in vitro*.

O efeito de diferentes substâncias sobre a actividade de pituitárias de *Sparus aurata* L. incubadas *in vitro*, no que respeita à síntese e secreção da GH sintetizada *de novo*, foi analisado utilizando como traçador a ^3H -leucina. Foi testado o efeito de diferentes dosagens de somatostatina (SS-14), GRF, galanina e o efeito de tratamentos com galanina e GRF simultaneamente. Aproveitando peixes tratados *in vivo* com estradiol 17- β para experiências de outros grupos de trabalho, fez-se um estudo preliminar sobre o efeito do tratamento *in vitro* com galanina das pituitárias daqueles peixes.

Experiências sobre o efeito da somatostatina

Parece estar estabelecido que a somatostatina é um peptídeo com efeitos sobre a síntese e secreção de GH *in vitro*, estando no entanto, duma maneira geral, mais estudado o efeito da somatostatina sobre a secreção do que sobre a síntese de GH.

Nos mamíferos, inibe a secreção mais do que a síntese, conduzindo a um armazenamento da GH sintetizada na pituitária. No entanto baixas concentrações de somatostatina ou os seus produtos metabólicos (que ocorrem no fim do período das culturas) parecem estimular a secreção de GH (Hall *et al.*, 1986). Nas aves a somatostatina inibe a secreção de GH, embora o efeito inibidor seja mais relevante quando houve uma estimulação prévia da secreção com GRF ou TRH (Hall *et al.*, 1986). Nos répteis, apenas nos anuros a somatostatina inibe a secreção de GH,

depois da secreção ter sido previamente estimulada em pituitárias tratadas com extractos hipotalâmicos (Hall e Chadwick, 1984).

Tabela III.1 - Efeito da somatostatina sobre a síntese e secreção da GH

Data	SS-14 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	n	Contagem radioactiva (cpm) a)			
			Pituitária	n	Meio	Total
Junho - 93	8	9	*1255,89 \pm 281,18	4	610,54 \pm 139,59	1866,43 \pm 441,08
	40	9	*1841,67 \pm 339,28	3	460,60 \pm 16,17	*2302,27 \pm 606,98
	80	9	486,02 \pm 149,12	4	932,78 \pm 391,82	1418,80 \pm 336,21
	controlo	10	687,93 \pm 118,21	3	464,81 \pm 42,34	1152,74 \pm 223,53
Fev. - 94	8	10	254,31 \pm 13,78	10	*1719,22 \pm 408,82	*1973,50 \pm 409,05
	40	9	*200,53 \pm 12,42	10	*1261,00 \pm 283,27	1461,53 \pm 299,70
	80	6	302,38 \pm 35,58	10	**1449,60 \pm 220,01	*1751,98 \pm 289,31
	controlo	10	238,32 \pm 13,66	8	820,70 \pm 277,93	1059,02 \pm 247,12
Agosto - 94	0,5	10	1927,16 \pm 190,41	10	1825,82 \pm 110,39	3752,98 \pm 139,24
	controlo	9	1946,53 \pm 164,33	9	1952,49 \pm 88,96	3899,02 \pm 208,99

a) Média \pm erro padrão

* Significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$

** Significativamente diferente do controlo a $P < 0,01$

Nos peixes, estudos imunocitoquímicos mostram a presença de somatostatina não só no tracto digestivo e no pâncreas, como por exemplo em *Sparus aurata* (Elbal M. T. *et al.*, 1986; Abad M. E. *et al.*, 1986) ou do elasmobrânquio *Torpedo marmorata* (Conlon *et al.*, 1985), como também na *pars distalis* proximal dos teleósteos (Dubois *et al.*, 1979; Abad *et al.*, 1990). A associação entre fibras nervosas SRIF-imunoreactivas e as células de GH nas pituitárias de alguns teleósteos, fornece uma indicação anatómica de que eventualmente existe uma relação funcional entre aquelas fibras e as células de GH (Marchant *et al.*, 1989).

A maior parte dos estudos *in vitro* são sobre o efeito inibidor da somatostatina na secreção de GH em pituitárias. Este efeito foi inicialmente observado em tilapia (Fryer *et al.*, 1979; Ball, 1981); estudos posteriores em *Poecilia latippina* (Wigham *et al.*, 1984) e na truta arco-íris (Luo *et al.*, 1990) mostraram que a somatostatina inibe a secreção de GH com potência dependente da dose utilizada. O efeito inibidor da somatostatina na secreção de GH pelas pituitárias *in vitro* parece diminuir com a idade, pelo menos em tilapia (Helms *et al.*, 1987).

Recentemente, estudos em truta arco-íris, mostram que a SS-14 inibe não só a secreção como também a síntese de

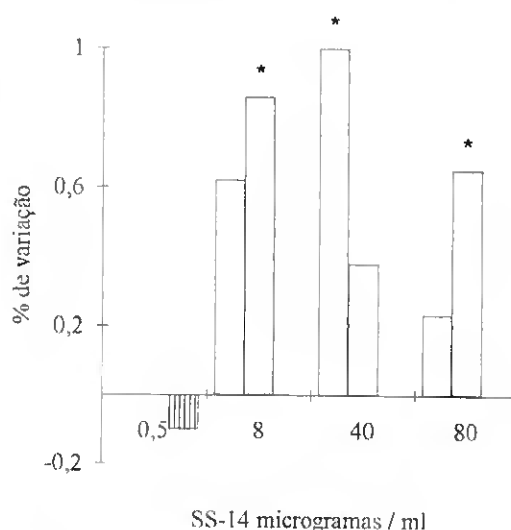


Figura III.8 - Efeito de diferentes dosagens de somatostatina na síntese de GH em Junho 93 (barras brancas), em Fevereiro 94 (barras sombreadas) e Agosto 94 (barra riscada). Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. *significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$.

GH em pituitárias incubadas *in vitro*, sendo a dose efectiva bastante superior à dose efectiva utilizada em mamíferos (Yada T. *et al.*, 1992).

Relativamente poucos estudos se têm realizado *in vivo*; em *Carassius auratus* a somatostatina tem um efeito transitório inibidor sobre a secreção de GH (Cook *et al.*, 1984). Uma variação sazonal da quantidade de somatostatina na pituitária e sua relação com o nível de GH no plasma foi descrita para aquela espécie (Marchant *et al.*, 1989). Para níveis elevados de GH no plasma (que eventualmente se podem relacionar com uma maior secreção de GH) a quantidade de somatostatina na pituitária atinge o mais baixo nível durante o ano, enquanto que níveis altos de somatostatina na pituitária correspondem aos mais baixos valores de GH no plasma.

Os autores sugerem que a somatostatina tem um efeito inibidor sobre a secreção de GH, dependente da quantidade de somatostatina presente na pituitária e com uma variação sazonal nítida.

No presente trabalho (tabela III.1, figuras III.8 e III.9), para as amostragens realizadas em Junho-93 e Fevereiro-94, a somatostatina teve um efeito estimulador quer na síntese quer na secreção de GH; a dose de 0,5 µg/ml, utilizada em Agosto-94 parece ter um ligeiro efeito inibidor, embora o valor obtido não seja significativamente diferente do controlo. Uma dose de 0,5 µg/ml foi encontrada como efectiva na inibição da secreção de GH por Yada *et al.* (1985), não sendo esta conclusão tão evidente no presente trabalho. Parece poder concluir-se que a estimulação da síntese e secreção de GH verificadas com doses iguais ou superiores a 8 µg/ml se deve a um efeito farmacológico da SS-14 sobre as células somatotrópicas.

No entanto é interessante verificar que o efeito da droga não altera o mecanismo prevaecente na época em que foram feitas as amostragens: em Junho-93 e em Agosto-94, a quantidade de hormona secretada é inferior ou igual à quantidade retida nas pituitárias sem tratamento, mantendo-se este mecanismo praticamente em todas as pituitárias tratadas com SS-14. Em Fevereiro-94 (finais da época de reprodução) há uma tendência da maior parte da GH ser secretada para o meio exterior, ficando retido nas pituitárias menos de metade do total sintetizado. Como os animais na experiência feita em Fevereiro-94 foram anestesiados com quinaldina, resta-nos dúvidas se o mecanismo de secreção de GH está apenas relacionado com o estado fisiológico do animal (tendo portanto uma variação sazonal relacionada com o ciclo de reprodução) ou, se sobreposta a esta eventual variação, a anestesia tem qualquer efeito sobre aquele mecanismo.

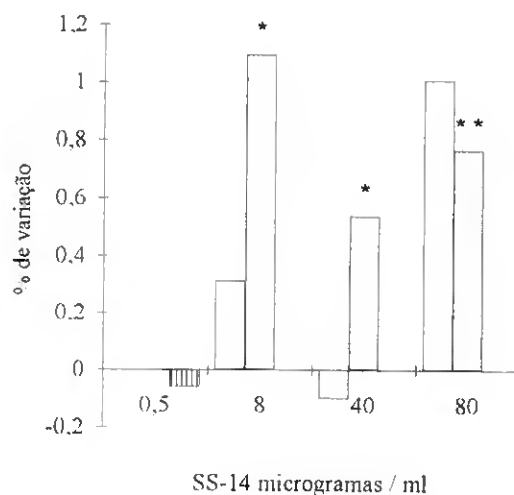


Figura III.9 - Efeito de diferentes dosagens de somatostatina na secreção de GH em Junho 93 (barras brancas), em Fevereiro 94 (barras sombreadas) e Agosto 94 (barra riscada). Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. *, **, significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$ e a $P < 0,01$, respectivamente.

Experiências sobre o efeito do GRF

Em mamíferos, a acção do GRF é estimular a secreção de GH *in vitro*, verificando-se uma acção de estimulação da síntese e da secreção apenas quando as pituitárias são incubadas durante períodos longos. Estudos *in vivo* no rato mostram que as respostas são significativamente maiores em animais anestesiados do que em animais conscientes, a não ser quando estes são sujeitos a um pré-tratamento com SRIF (Hall *et al.*, 1986).

Tabela III.2 - Efeito do GRF sobre a síntese e secreção da GH

Data	GRF ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	n	Contagem radioactiva (cpm) a)			
			Pituitária	n	Meio	Total
Julho - 93	1	12	747,14 \pm 81,56	4	1029,96 \pm 90,55	*1777,10 \pm 152,48
	7	10	596,10 \pm 81,65	4	645,60 \pm 110,01	1241,70 \pm 147,43
	14	12	513,27 \pm 74,50	4	662,62 \pm 114,46	1175,89 \pm 145,56
	controlo	11	587,27 \pm 56,63	3	795,64 \pm 75,15	1382,91 \pm 116,92

a) Média \pm erro padrão

* Significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$

** Significativamente diferente do controlo a $P < 0,01$

Nas aves o efeito estimulador do GRF sobre a secreção de GH *in vivo* é também mais evidente em animais anestesiados do que em animais conscientes (Harvey *et al.*, 1985), estando a magnitude do efeito dependente da idade (Scanes *et al.*, 1984).

Nos répteis, apenas no grupo dos anuros a secreção de GH parece estar dependente do aGRF (Ball, 1981).

Nos peixes, o GRF existe no cérebro e na pituitária de alguns teleosteos (Yada *et al.*, 1992) parecendo estar associado às células de GH (Marivoet *et al.*, 1988). Verificou-se que dois factores purificados do cérebro da carpa (GRF 1-45 e GRF 1-29) estimulam a secreção de GH na truta arco-íris, com uma potência dependente da dose (Luo *et al.*, 1990). Em pituitárias de truta arco-íris incubadas *in vitro* o GRF parece não ter efeito sobre a síntese de GH, a não ser quando houve uma inibição prévia da síntese com somatostatina (Yada *et al.*, 1992).

Os resultados da experiência efectuada com *Sparus aurata* L. (tabela III.2 e figuras III.10 e III.11) mostram um significativo efeito estimulador do GRF na síntese de GH, para uma dose daquele factor de $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Para a mesma dose, a secreção é também estimulada, embora não tão activamente quanto a síntese. Em doses mais elevadas, o GRF parece ter um efeito inibidor sobre a síntese e secreção de GH, embora os valores obtidos não sejam significativamente diferentes do controlo.

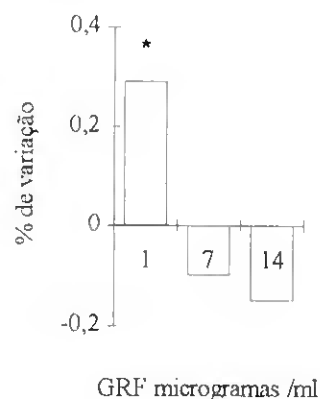


Figura III.10 - Efeito de diferentes dosagens de GRF na síntese de GH (Julho 93). Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. * significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$.

Experiências sobre o efeito da galanina

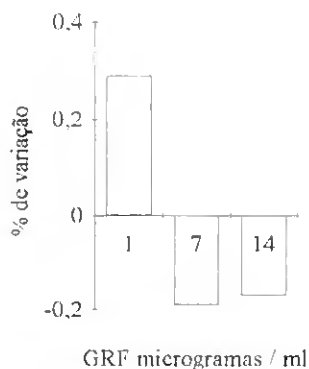


Figura III.11 - Efeito de diferentes dosagens de GRF na secreção de GH (Julho 93). Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controle.

A galanina é um neuropeptídeo cuja actividade biológica nos mamíferos inclui a regulação das secreções da parte anterior da pituitária (Torsello *et al.*, 1992). Neste grupo de animais a galanina está amplamente distribuída nos sistemas nervoso central, respiratório, digestivo e reprodutor.

Estudos imunocitoquímicos na rã (*Rana temporaria*) e na truta arco íris (*Salmo gairdneri*) mostram a localização deste neuropeptídeo no cérebro destes animais (Wolfbauer *et al.*, 1989). Mas estudos sobre o efeito fisiológico da galanina na síntese e secreção de GH nos peixes são praticamente inexistentes.

No presente trabalho (tabela III.3 e figuras III.12 e III.13) o efeito parece estar dependente da época do ano: durante o Verão (experiências de Junho-93 e Agosto-93) a galanina parece não ter qualquer efeito sobre a síntese de GH *in vitro*. O mesmo ocorre em relação à secreção com excepção da aplicação de uma dose de 3 µg/ml, em que a secreção é significativamente inibida.

Tabela III.3 - Efeito da galanina sobre a síntese e secreção da GH

Data	galanina (µg/ml)	n	Contagem radioactiva (cpm) a)			
			Pituitária	n	Mcio	Total
Junho - 93	0,4	7	537,16 ± 107,99	4	511,77 ± 156,90	1048,93 ± 185,14
	2	11	737,09 ± 42,89	4	444,54 ± 107,17	1181,63 ± 94,45
	3	10	821,63 ± 51,68	4	*179,90 ± 16,59	1001,53 ± 84,30
	controle	10	687,93 ± 118,21	3	464,81 ± 42,34	1152,74 ± 223,53
Agosto - 93	2	2	595,30 ± 79,65	3	252,03 ± 33,45	847,33 ± 73,41
	controle	3	1112,28 ± 186,63	1	144,35	1256,35
Janeiro - 94	2	6	331,44 ± 54,40	3	366,17 ± 100,61	697,61 ± 103,34
	controle	6	358,12 ± 29,34	3	261,08 ± 26,16	619,20 ± 46,24
Fev. - 94	0,4	9	**800,41 ± 72,50	9	1134,53 ± 99,80	*1934,94 ± 123,35
	2	8	**676,81 ± 52,79	8	1123,96 ± 130,15	*1800,77 ± 140,45
	4	10	**379,53 ± 47,35	7	1183,92 ± 184,84	*1563,45 ± 162,79
	6	10	**903,36 ± 83,21	10	*1742,23 ± 287,27	*2645,59 ± 299,08
	controle	10	238,32 ± 13,66	8	820,70 ± 277,93	1059,02 ± 247,12

a) Média ± erro padrão

* Significativamente diferente do controle a $P < 0,05$

** Significativamente diferente do controle a $P < 0,01$

Durante o Inverno (experiências de Janeiro-94 e Fevereiro-94) a síntese e a secreção são estimuladas pela galanina, sendo o efeito mais significativo sobre a síntese do que sobre a secreção. No entanto, dado que a conclusão para a experiência feita em Janeiro-94 se baseia num número muito pequeno de pituitárias (n=6) e na experiência desenvolvida no mês seguinte os peixes foram sujeitos a uma anestesia com quinaldina, ficam dúvidas se a resposta ao tratamento com galanina apresenta na realidade uma

variação sazonal ou se a estimulação pela galanina está relacionada, de qualquer maneira, com o facto de os peixes terem sido sujeitos a uma anestesia.

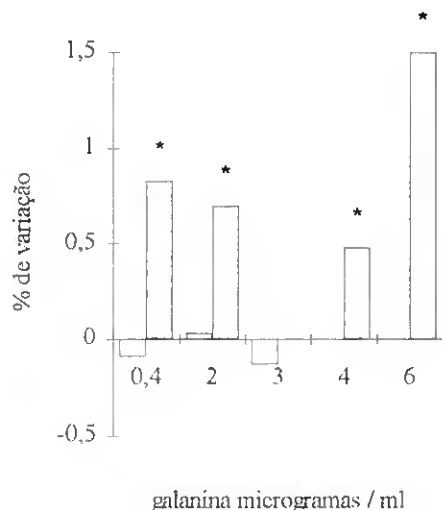


Figura III.12 - Efeito de diferentes dosagens de galanina na síntese de GH em Junho 93 (barras brancas) e Fevereiro 94. Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. * significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$.

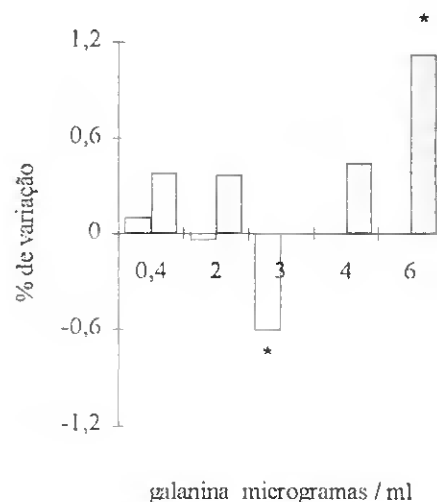


Figura III.13 - Efeito de diferentes dosagens de galanina na secreção de GH em Junho 93 (barras brancas) e Fevereiro 94. Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. * significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$.

Experiências sobre o efeito conjunto da galanina e GRF

Na experiência efectuada durante o Verão (tabela III.4) verifica-se que, tal como anteriormente descrito para o efeito do GRF, a síntese e a secreção são estimuladas para baixas concentrações deste factor e inibidas quando a sua concentração é aumentada.

Tabela III.4 -Efeito da galanina e GRF sobre a síntese e secreção da GH

Data	galanina (µg/ml)	GRF (µg/ml)	n	Contagem radioactiva (cpm) a)			
				Pituitária	n	Meio	Total
Julho-93	3	1	12	577,65 ± 82,03	4	1048,19 ± 241,19	1625,84 ± 194,34
	"	3	12	688,51 ± 71,14	4	876,54 ± 182,73	1565,05 ± 159,52
	"	7	12	714,10 ± 99,42	4	607,76 ± 60,00	1321,86 ± 179,15
	0	1	12	747,14 ± 81,56	4	1029,96 ± 90,55	**1777,10 ± 152,48
	0	7	10	258,21 ± 81,65	4	645,60 ± 110,01	**903,81 ± 147,43
	0	14	12	258,07 ± 74,50	4	662,62 ± 114,46	**920,69 ± 145,56
		controlo		11	587,27 ± 56,63	3	795,64 ± 75,15
Fev. - 94	2	2	9	244,76 ± 10,68	9	937,25 ± 123,00	1182,01 ± 123,46
	2	0	8	**676,81 ± 52,79	8	1123,96 ± 130,15	*1800,77 ± 140,45
		controlo	10	238,32 ± 13,66	8	820,70 ± 277,93	1059,02 ± 247,12

a) Média ± erro padrão

* Significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$

** Significativamente diferente do controlo a $P < 0,01$

A galanina parece actuar com o GRF quer na síntese quer na secreção de GH, mas com mecanismos diferentes. Na secreção parece haver um sinergismo entre a galanina e o GRF (figura III.15), sendo os efeitos de estimulação ou de inibição provocadas pelo GRF aumentados na presença daquele neuropeptídeo. Pelo contrário, na síntese de GH (figura III.14), parece que a galanina antagonisa com o GRF, diminuindo quer o efeito estimulador quer o inibidor deste.

Na experiência de Fevereiro-94, para uma concentração de galanina ainda mais baixa da utilizada em Julho-93, parece existir antagonismo entre galanina e GRF na síntese e na secreção de GH.

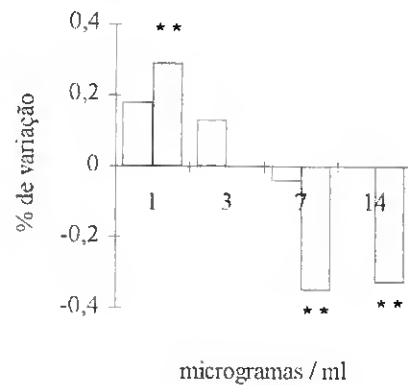


Figura III.14 - Efeitos sobre a síntese de GH de diferentes dosagens de GRF (barras sombreadas) e de GRF + 3 µg/ml de galanina (barras brancas) durante a experiência efectuada em Julho 93. Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. ** significativamente diferente do controlo a $P < 0,01$.

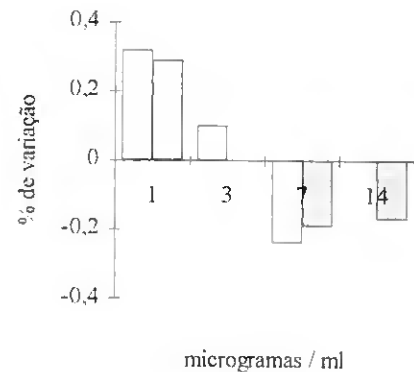


Figura III.15 - Efeitos sobre a secreção de GH de diferentes dosagens de GRF (barras sombreadas) e de GRF + 3 µg/ml de galanina (barras brancas) durante a experiência efectuada em Julho 93. Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo.

Experiências sobre o efeito da galanina em peixes tratados in vivo com estradiol 17-β

De um modo geral as hormonas sexuais parecem aumentar a sensibilidade da pituitária a efeitos estimuladores de outros factores na secreção de GH (Hall *et al.*, 1986).

No rato, a síntese de galanina parece ser induzida pelo nível de estrogénios no plasma (Torsello *et al.*, 1992). Em macacos o E₂ acelera o crescimento, embora não seja claro se através de um efeito directo na GH ou induzindo o aumento da libertação de GH-IGF-I (Wilson *et al.*, 1993). Nas aves, estudos feitos em galinhas indicam que o estradiol reduz a resposta da estimulação da secreção de GH pela TRH (Hall *et al.*, 1984). Nos répteis, à semelhança do que acontece com os mamíferos, o efeito estimulador de extractos hipotalâmicos sobre a secreção de GH em pituitárias de tartarugas (*Chrysemys picta*) é aumentado se os animais forem sujeitos a um pré-tratamento com estradiol (Hall *et al.*, 1986).

Nos peixes são praticamente inexistentes os estudos sobre a relação entre as hormonas sexuais e a GH. Relativamente a este assunto apenas é referido que, em *Carassius auratus*, o "turnover" de serotonina (neurotransmissor envolvido na

regulação da secreção de GH) é afectado pelo tratamento com um antiestrogéneo não esteróide (Olcese *et al.*, 1981; Hall *et al.*, 1986).

Tabela III.5 - Efeito da galanina sobre a síntese e secreção da GH, em peixes tratados com estradiol 17- β

Data	galanina ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	n	Contagem radioactiva (cpm) a)			
			Pituitária	n	Meio	Total
Agosto - 93	2	2	595,30 \pm 79,65	3	252,03 \pm 33,45	847,33 \pm 73,41
	controlo	3	1112,28 \pm 186,63	1	144,35	1256,35
	2 b)	2	751,05 \pm 109,95	3	480,98 \pm 129,41	1232,03 \pm 186,09
	controlo b)	3	591,63 \pm 51,82	3	204,91 \pm 36,83	796,54 \pm 63,57
	2 c)	3	759,55 \pm 124,81	3	786,78 \pm 144,87	1546,33 \pm 191,22
	controlo c)	3	646,75 \pm 24,78	1	843,20	1489,95
Janeiro -94	2	6	331,44 \pm 54,40	3	366,17 \pm 100,61	697,61 \pm 103,34
	controlo	6	358,12 \pm 29,34	3	261,08 \pm 26,16	619,20 \pm 46,24
	2 d)	8	344,66 \pm 28,86	4	133,86 \pm 11,56	*478,52 \pm 42,53
	controlo d)	8	326,73 \pm 70,26	4	*161,20 \pm 19,81	487,93 \pm 102,68

a) Média \pm erro padrão

b) Peixes alimentados com 2 mg de E₂ / kg de ração

c) Peixes alimentados com 15 mg de E₂ / kg de ração

d) Peixes alimentados com 10 mg de E₂ / kg de ração

* Significativamente diferente do controlo a P < 0,05

NOTA: Para Agosto não foi feito teste-t para comparação entre médias devido ao reduzido tamanho das amostras

No presente trabalho o reduzido tamanho das amostras (tabela III.5) apenas permite uma análise e conclusão preliminares sobre o efeito do estradiol 17- β na síntese e secreção de GH. Durante o Verão, a síntese e secreção de GH parecem ser pouco estimuladas nos peixes alimentados com 2 mg de E₂/kg de ração, aumentando aquelas quando as pituitárias são tratadas com galanina. A galanina parece não ter qualquer efeito quando existe uma grande estimulação da síntese e secreção de GH nos peixes alimentados com 15 mg de E₂/kg de ração.

No final da época de reprodução (Janeiro-94), o alimento com estradiol parece inibir a síntese e a secreção de GH.

Controlo sobre a GH

A síntese e secreção de GH em *Sparus aurata* L. parece ter uma variação sazonal, com uma tendência para uma maior síntese durante o Verão, ficando a maior parte da hormona sintetizada retida na pituitária. Inversamente, no fim do Inverno, período em que termina a época de reprodução, a síntese de GH parece diminuir mas a maior parte da GH sintetizada é secretada para o meio de cultura.

A somatostatina, quando em concentrações entre 8 e 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estimula a síntese e secreção de GH, provavelmente por um efeito farmacológico sobre as células somatotrópicas. Uma dose de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ parece estar mais perto da concentração com um efeito fisiológico sobre aquelas células, embora não se possa concluir que seja a dose efectiva de inibição encontrada para outras espécies de teleosteos.

O GRF parece poder considerar-se um importante factor hipotalâmico estimulador em *Sparus aurata* L., com maior efeito sobre a síntese do que na secreção de GH. Uma estimulação significativa é obtida para baixas concentrações de GRF, sendo de 1 µg/ml a dose efectiva de estimulação.

O efeito da galanina sobre a actividade das células de GH varia sazonalmente, estimulando a síntese mais do que a secreção durante o fim do período reprodutor e aparentemente sem qualquer efeito sobre as células somatotrópicas durante o Verão. Um padrão aparentemente mais complexo é observado quando a galanina actua em conjunto com o GRF: os dois neuropeptídeos têm efeitos antagónicos sobre a síntese de GH, sendo a estimulação da síntese feita com um nível mais baixo do que quando o GRF ou a galanina actuam isoladamente. Sobre a actividade secretória das células somatotrópicas, embora ainda estimulada pela acção conjunta dos dois neuropeptídeos, parece existir um sinergismo durante o Verão; no Inverno, pelo menos em relação à galanina, a acção entre os dois neuropeptídeos é antagónica.

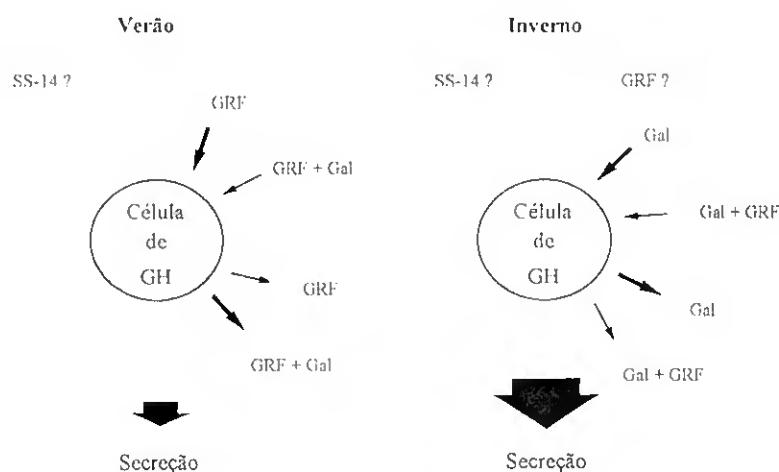


Figura III.16 - Representação esquemática dos principais factores de inibição (parte esquerda da figura) e de estimulação (parte direita da figura) da síntese e secreção de GH. A espessura das setas está grosseiramente relacionada com a intensidade da estimulação ou inibição.

A figura III.16 mostra esquematicamente as conclusões anteriores, não tendo sido incluída a acção conjunta da galanina e estradiol 17-β, uma vez os resultados da experiência são de certo modo inconclusivos, devido ao número reduzido de peixes analisados. Como conclusão preliminar, parece haver uma estimulação da síntese e secreção de GH pelo estradiol eventualmente existente no plasma. Esta estimulação é ainda aumentada quando as pituitárias são tratadas com galanina, o que sugere um sinergismo galanina-estradiol-17-β possivelmente relacionado com o aumento da sensibilidade da pituitária ao efeito estimulador da galanina provocado pelo estrogéneo.

Parece assim poder concluir-se que o GRF é um factor hipotalâmico estimulador, mais da síntese do que da secreção de GH, em *Sparus aurata* L. O neuropeptídeo galanina, além de interferir com a acção do GRF (em sinergismo ou antagonismo) tem um efeito estimulador directo sobre a actividade das células

somatotrópicas. O tratamento *in vivo* com estradiol-17- β não só parece aumentar a síntese e secreção de GH em pituitárias incubadas *in vitro*, como também as torna mais sensíveis ao efeito estimulador da galanina. Não foram conclusivos os resultados sobre o efeito inibidor da síntese e secreção de GH pela SS-14 na espécie *Sparus aurata* L.

A variação sazonal da intensidade da acção dos diferentes factores e do modelo de secreção e síntese nas pituitárias incubadas *in vitro*, faz supor existir também uma regulação ambiental da secreção e síntese de GH, em que o fotoperíodo, o estado nutricional do animal ou a sua fase de maturação sexual provavelmente têm grande influência.

2. Controlo sobre a síntese e secreção de PRL em pituitárias incubadas *in vitro*.

O efeito de diferentes substâncias sobre a actividade de pituitárias de *Sparus aurata* L. incubadas *in vitro*, no que respeita à síntese e secreção da PRL sintetizada *de novo*, foi analisado utilizando como traçador a ^3H -leucina. Foi testado o efeito de diferentes dosagens de somatostatina (SS-14), GRF, galanina e o efeito de tratamentos com galanina e GRF simultaneamente. Aproveitando peixes tratados *in vivo* com estradiol 17- β para experiências de outros grupos de trabalho, fez-se um estudo preliminar sobre o efeito do tratamento *in vitro* com galanina das pituitárias daqueles peixes.

Embora para peixes eurialinos a pressão osmótica do meio ou a presença dos iões Na^+ e Ca^{2+} sejam fundamentais para a actividade das células de PRL *in vitro* (Wigham *et al.*, 1977; Dubourg *et al.*, 1980; Johnston e Wigham, 1990), para a espécie *Sparus aurata* L. parece não ter um efeito significativo, tendo sido utilizado um meio de cultura hipotónico em relação ao plasma do animal.

Experiências sobre o efeito da somatostatina

A secreção de PRL parece estar predominantemente controlada por um factor inibitório (PIF); um número relativamente grande de trabalhos têm indicado a dopamina como PIF (Ball, 1981) mas há alguma evidência que a somatostatina (SS-14) exerça também um controlo inibitório sobre a secreção de PRL.

Em aves, estudos feitos em pituitárias de galinha mostram que a somatostatina não inibe a secreção basal de PRL mas tende a inibir a secreção estimulada por TRH (Clarke e Bern, 1980).

Nos peixes, já anteriormente foi referido que a somatostatina está presente não só no tracto digestivo e no pâncreas, como também na *pars distalis*

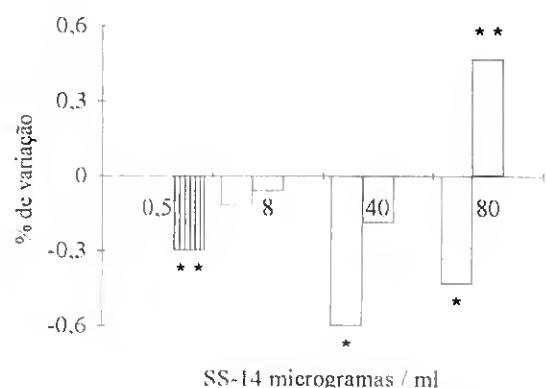


Figura III.17 - Efeito de diferentes dosagens de SS-14 na síntese de PRL em Junho 93 (barras brancas), Fevereiro 94 (barras sombreadas) e Agosto 94 (barra riscada). Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. *, **, significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente.

proximal de algumas espécies (Dubois *et al.*, 1979; Conlon *et al.*, 1985; Elbal *et al.*, 1986; Abad *et al.*, 1986). Estudos imunocitoquímicos em tilapia mostram que a somatostatina está presente no cérebro, em todas as regiões da neurohipófise e nas fibras nervosas que penetram na adenohipófise, sugerindo existir uma acção deste neuropeptídeo no controlo de vários tipos de células, incluindo as de PRL; o mecanismo da distribuição de somatostatina às células de PRL não está ainda determinado (Grau *et al.*, 1985).

Estudos anteriores feitos em tilapia mostraram que a somatostatina inibe fortemente a secreção de PRL; no entanto, parece não ter um efeito inibidor tão forte na síntese quando o meio é hiperosmótico (Wigham *et al.*, 1977). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), tem-se obtido resultados contraditórios: em algumas experiências a somatostatina não teve qualquer efeito na secreção de PRL para o meio de cultura (Yada *et al.*, 1992), enquanto que noutras experiências verificou-se uma inibição máxima da secreção de PRL, 24 horas após o tratamento com somatostatina (Le Goff *et al.*, 1992). Verificou-se que a somatostatina não tem um efeito significativo na síntese de PRL em *O. mykiss* (Le Goff *et al.*, 1992).

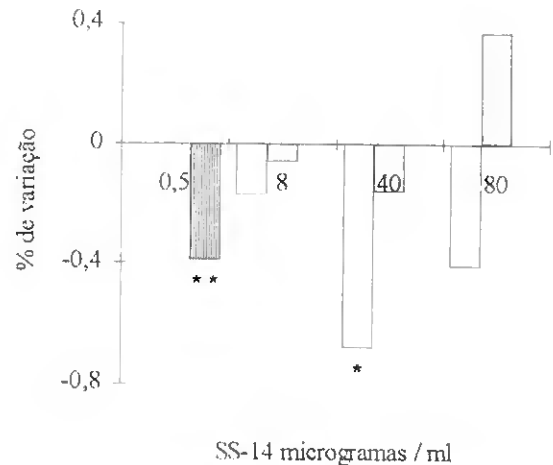


Figura III.18 - Efeito de diferentes dosagens de SS-14 na secreção de PRL em Junho 93 (barras brancas), Fevereiro 94 (barras sombreadas) e Agosto 94 (barra riscada). Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. *, **, significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente.

Tabela III.6 - Efeito da somatostatina sobre a síntese e secreção da PRL

Data	SS-14 (µg / ml)	n	Contagem radioactiva (cpm) a)			
			Pituitária	n	Meio	Total
Junho - 93	8	9	966,26 ± 91,50	4	3901,38 ± 1462,92	4867,64 ± 928,91
	40	9	719,49 ± 118,83	3	*1477,31 ± 396,64	*2196,80 ± 295,19
	80	8	*381,20 ± 130,20	3	2761,59 ± 1315,33	*3142,79 ± 759,55
	controlo	10	855,59 ± 180,02	3	4684,69 ± 712,72	5540,28 ± 484,73
Fev. - 94	8	10	254,93 ± 25,91	10	291,88 ± 72,91	546,81 ± 77,38
	40	10	*212,88 ± 12,08	9	259,97 ± 55,09	472,85 ± 53,63
	80	9	**429,85 ± 30,83	8	423,88 ± 79,16	**853,73 ± 81,25
	controlo	10	270,52 ± 21,30	7	309,65 ± 102,04	580,17 ± 87,99
Agosto - 94	0,5	10	1069,34 ± 81,61	10	**1397,80 ± 76,76	*2467,14 ± 131,12
	controlo	9	1226,05 ± 58,56	9	2300,54 ± 152,81	3526,59 ± 169,17

a) Média ± erro padrão

* Significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$

** Significativamente diferente do controlo a $P < 0,01$

No presente trabalho (tabela III.6, figuras III.17 e III.18) a somatostatina tem um efeito significativamente inibidor e parece que dependente da dose utilizada, com um máximo de inibição para uma concentração de SS-14 de 40 µg/ml. Para uma concentração de 80 µg/ml o efeito é oposto nas duas experiências, o que pode indicar existir um efeito mais farmacológico do que fisiológico para aquela concentração de SS-14.

É interessante verificar que, ao contrário do que aparece descrito na bibliografia para a dopamina, cujo efeito inibidor só se faz sentir em relação à secreção parecendo não interferir na síntese (*in* Chester-Jones *et al.*, 1987), a somatostatina (SS-14) parece exercer um efeito inibitório quer na secreção quer na síntese de PRL, pelo menos na espécie estudada, *Sparus aurata* L.

Experiências sobre o efeito do GRF

Há evidências de que além de um factor inibidor da PRL existe um factor estimulador desta hormona (Fiorindo *et al.*, 1980; Ball, 1981; Wigham *et al.*, 1984; Chester-Jones *et al.*, 1987). Como já anteriormente foi referido, o GRF existe no cérebro e na pituitária de alguns teleosteos (Yada *et al.*, 1992), mas estudos sobre o efeito fisiológico deste neuropeptídeo na síntese e secreção de PRL são praticamente inexistentes.

Tabela III.7 - Efeito do GRF sobre a síntese e secreção da PRL

Data	GRF (µg / ml)	Contagem radioactiva (cpm) a)				
		n	Pituitária	n	Meio	Total
Julho - 93	1	12	*834.86 ± 124.26	3	1915.72 ± 500.10	*2750.58 ± 336.78
	7	12	*861.42 ± 159.38	4	1623.32 ± 326.33	*2484.74 ± 332.06
	14	12	662.83 ± 83.16	4	1634.78 ± 498.51	*2297.61 ± 304.53
	controlo	11	494.22 ± 54.40	3	973.09 ± 469.05	1467.31 ± 241.20

a) Média ± erro padrão

* significativamente diferente do controlo a P < 0.05.

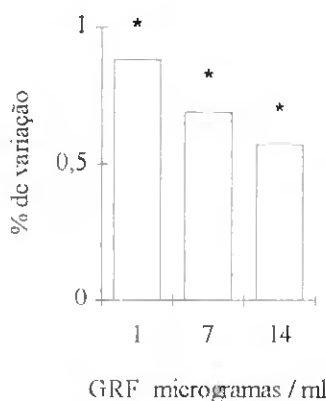


Figura III.19 - Efeito de diferentes dosagens de GRF na síntese de PRL (Julho 93). Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. * significativamente diferente do controlo a P<0,05.

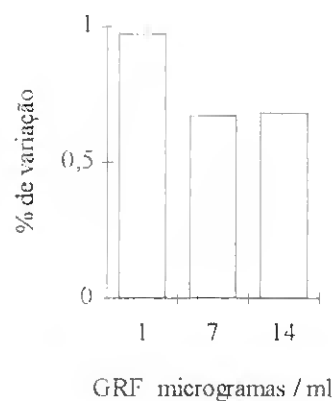


Figura III.20 - Efeito de diferentes dosagens de GRF na secreção de PRL (Julho 93). Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo.

Os resultados obtidos no presente trabalho (tabela III.7) permitem concluir que o GRF é um factor estimulador da síntese e da secreção de PRL, com um efeito dependente da dose utilizada (figuras III.19 e III.20). Embora na época em que foi feita a experiência (Julho-93) a quantidade de hormona secretada seja sempre maior do que a quantidade retida residualmente na pituitária, o efeito estimulador do GRF é mais significativo na síntese do que na secreção de PRL.

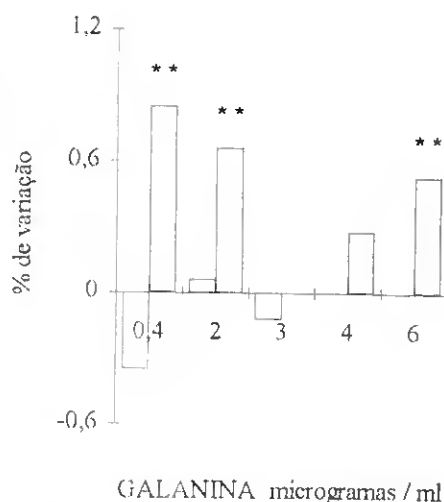


Figura III.21 - Efeito de diferentes dosagens de galanina na síntese de PRL em Junho 93 (barras brancas) e Fevereiro 94. Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. ** significativamente diferente do controlo a $P < 0.01$.

Experiências sobre o efeito da galanina

O efeito da galanina na actividade das células de PRL tem sido pouco estudado, embora se conheça a sua ampla distribuição em diferentes órgãos, incluindo o cérebro, dos mamíferos, répteis e teleósteos (Wolfbauer *et al.*, 1989; Torsello *et al.*, 1992).

Tabela III.8 - Efeito da galanina sobre a síntese e secreção da PRL

Data	galanina (µg / ml)	n	Contagem radioactiva (cpm) a)			
			Pituitária	n	Meio	Total
Junho - 93	0,4	7	1978,55 ± 536,44	2	1648,83 ± 987,33	3627,38 ± 1135,35
	2	11	*2111,17 ± 387,96	2	3755,48 ± 446,45	5866,65 ± 954,36
	3	9	**2949,17 ± 278,99	4	1891,02 ± 293,08	4840,19 ± 466,70
	controlo	10	855,59 ± 180,02	3	4684,69 ± 712,72	5540,28 ± 484,73
Agosto - 93	2	2	1019,88 ± 344,93	3	1747,90 ± 241,01	2767,78 ± 403,62
	controlo	3	854,80 ± 10,29	1	731,68	1586,48
Janeiro - 94	2	5	*341,91 ± 61,49	3	253,36 ± 15,96	*595,27 ± 82,81
	controlo	6	531,52 ± 39,66	3	377,82 ± 117,46	909,34 ± 96,35
Fev. - 94	0,4	10	**841,00 ± 78,05	9	231,36 ± 33,01	**1072,36 ± 88,22
	2	8	**743,93 ± 41,33	8	216,97 ± 32,44	** 960,90 ± 52,54
	4	8	**413,67 ± 26,30	9	331,13 ± 84,50	744,80 ± 93,28
	6	10	**662,52 ± 48,80	10	222,74 ± 55,38	** 885,26 ± 73,81
	controlo	10	270,52 ± 21,30	7	309,65 ± 102,04	580,17 ± 87,99

a) Média ± erro padrão

* Significativamente diferente do controlo a $P < 0.05$

** Significativamente diferente do controlo a $P < 0.01$

Dos resultados obtidos no presente trabalho (tabela III.8) conclui-se que a galanina, importante factor estimulador da síntese de PRL em Fevereiro, não tem esta acção durante a experiência de Junho (figura III.21). É possível que o resultado obtido se possa relacionar com o ciclo reprodutor da espécie em estudo.

Sobre a secreção o efeito parece tender a ser inibidor, embora os valores obtidos não sejam significativamente inferiores aos do controlo (figura III.22).

Em qualquer das experiências feitas a galanina parece ter um efeito bloqueador sobre a secreção da hormona para o meio de cultura, o que se torna particularmente evidente em Fevereiro, quando a síntese é muito estimulada pela presença deste peptídeo.

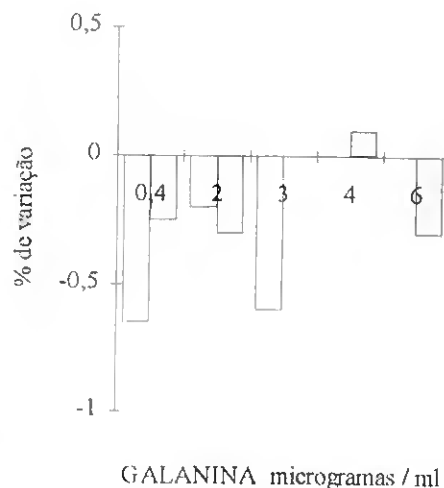


Figura III.22 - Efeito de diferentes dosagens de galanina na secreção de PRL em Junho 93 (barras brancas) e Fevereiro 94. Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo.

Experiências sobre o efeito conjunto da galanina e GRF

A galanina actua em antagonismo com o GRF (tabela III.9), sendo a sua acção semelhante na síntese e na secreção de PRL.

Tabela III.9 - Efeito da galanina e GRF sobre a síntese e secreção da PRL

Data	galanina ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	GRF ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	n	Contagem radioactiva (cpm) a)			
				Pituitária		Meio	
Julho-93	3	1	11	451,95 \pm 63,44	3	1048,67 \pm 339,62	1500,62 \pm 200,29
	"	3	12	688,56 \pm 78,33	3	1243,21 \pm 281,74	1931,77 \pm 203,03
	"	7	12	796,87 \pm 176,65	4	1482,00 \pm 316,12	*2278,87 \pm 355,85
	0	1	12	*834,86 \pm 124,26	3	1915,72 \pm 500,10	**2750,58 \pm 336,78
	0	7	12	*861,42 \pm 159,38	4	1623,32 \pm 326,33	**2484,74 \pm 332,06
	0	14	12	662,84 \pm 83,16	4	1634,78 \pm 498,51	*2297,62 \pm 304,53
		controlo	11	494,22 \pm 54,40	3	973,09 \pm 469,05	1467,31 \pm 241,20
Fev. - 94	2	2	9	233,78 \pm 8,65	10	270,47 \pm 59,17	504,25 \pm 63,09
	2	0	8	*743,93 \pm 41,33	8	216,97 \pm 32,44	**960,90 \pm 52,54
		controlo	10	270,52 \pm 21,30	7	309,65 \pm 102,04	580,17 \pm 87,99

a) Média \pm erro padrão

* Significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$

** Significativamente diferente do controlo a $P < 0,01$

Para uma dose de GRF de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, em que há uma estimulação máxima da síntese e secreção de PRL, o efeito antagonista da galanina é de tal modo importante que o nível de PRL sintetizado é da mesma ordem de grandeza do controlo (figura III.23). Para concentrações de GRF menos eficazes na estimulação da síntese, o efeito

antagonista da galanina é menor. O mesmo padrão é observado na secreção de PRL (figura III.24), com efeitos menores do que na síntese, uma vez que o GRF actua menos na secreção do que na síntese de PRL.

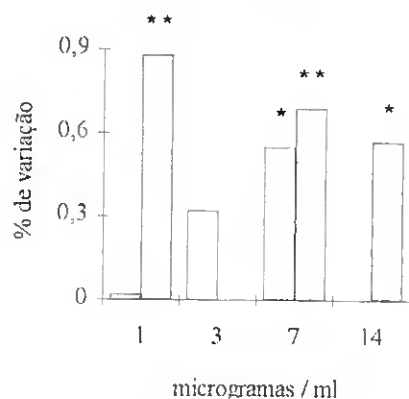


Figura III.23 - Efeitos sobre a síntese de PRL de diferentes dosagens de GRF (barras sombreadas) e de GRF + 3 µg/ml de galanina (barras brancas) durante a experiência efectuada em Julho 93. Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo. *, ** significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$ e a $P < 0,01$, respectivamente

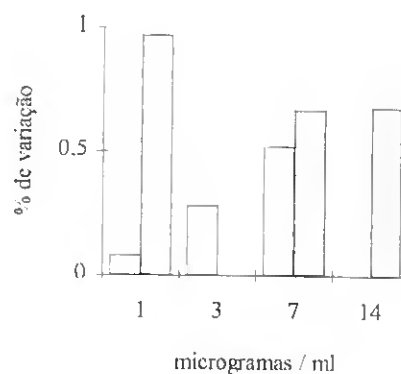


Figura III.24 - Efeitos sobre a secreção de PRL de diferentes dosagens de GRF (barras sombreadas) e de GRF + 3 µg/ml de galanina (barras brancas) durante a experiência efectuada em Julho 93. Valores expressos como percentagem da diferença entre cada tratamento e o controlo.

Experiências sobre o efeito da galanina em peixes tratados in vivo com estradiol-17β

Estudos em ratos, tartarugas e aves (*Meleagris gallopavo*) mostram que o estradiol-17β actua directamente na pituitária estimulando a secreção de PRL (Barry *et al.*, 1986; Clarke e Bern, 1980; Halawani *et al.*, 1983).

Em alguns teleósteos, a informação disponível sugere que o E₂ também regula a secreção e síntese de PRL (Barry *et al.*, 1986). Contudo, experiências em *Sarotherodon mossambicus* indicam que o estradiol-17β não tem efeito na síntese e secreção *in vitro* de PRL, embora subsista da parte dos autores a dúvida de o tempo de incubação (18 horas) não ter sido suficiente para estimular a síntese e conseqüente secreção (Wigham *et al.*, 1977).

No presente trabalho, o reduzido tamanho das amostras (tabela III.10) apenas permite uma análise e conclusão preliminares sobre o efeito conjunto do estradiol 17-β e da galanina na síntese e secreção de PRL.

De uma forma similar ao que se verificou com a GH, a síntese e secreção de PRL parecem ser pouco estimuladas nos peixes alimentados com 2 mg de E₂/kg de ração, aumentando aquelas quando as pituitárias são tratadas com galanina durante o Verão. A galanina parece não ter qualquer efeito quando existe uma grande estimulação da síntese e secreção de PRL nos peixes alimentados com 15 mg de E₂/kg de ração.

No final da época de reprodução (Janeiro-94), o alimento com estradiol parece inibir a síntese e a secreção de PRL.

Tabela III.10 - Efeito da galanina sobre a síntese e secreção da PRL, em peixes tratados com estradiol 17- β

Data	galanina ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	n	Contagem radioactiva (cpm) a)			
			Pituitária		Meio	Total
Agosto - 93	2	2	1019,88 \pm 344,93	3	1747,90 \pm 241,01	2767,78 \pm 403,62
	controlo	3	854,80 \pm 10,29	1	731,68	1586,48
	2 b)	3	1557,25 \pm 1020,25	2	1658,25 \pm 142,60	3215,50 \pm 1321,42
	controlo b)	3	901,90 \pm 476,07	3	1156,58 \pm 106,14	2058,48 \pm 487,76
	2 c)	3	604,93 \pm 25,73	3	1057,05 \pm 75,35	1661,98 \pm 79,62
	controlo c)	3	530,95 \pm 27,63	1	1127,38	1658,33
Janeiro -94	2	5	*341,91 \pm 61,49	3	*253,36 \pm 15,96	595,27 \pm 82,81
	controlo	6	**531,52 \pm 39,66	3	377,82 \pm 117,46	**909,34 \pm 96,35
	2 d)	8	272,34 \pm 96,29	4	250,33 \pm 125,17	522,67 \pm 162,85
	controlo d)	8	177,93 \pm 62,91	4	185,81 \pm 92,91	363,74 \pm 110,43

a) Média \pm erro padrão

b) Peixes alimentados com 2 mg de E₂ / kg de ração

c) Peixes alimentados com 15 mg de E₂ / kg de ração

d) Peixes alimentados com 10 mg de E₂ / kg de ração

* Significativamente diferente do controlo a $P < 0,05$

NOTA: Para Agosto não foi feito teste-t para comparação entre médias devido ao reduzido tamanho das amostras

Controlo da PRL

A síntese e secreção de PRL em *Sparus aurata* L. parece ter uma variação sazonal, com uma tendência para uma maior síntese durante o Verão, sendo a maior parte da hormona sintetizada libertada para o meio de cultura. No fim do Inverno, período em que termina a época de reprodução, a síntese de PRL parece ter uma tendência para diminuir; nesta época do ano a quantidade de PRL secretada para o meio de cultura é sensivelmente da mesma ordem de grandeza da quantidade de hormona sintetizada.

A somatostatina (SS-14) parece ser um importante factor inibitório da síntese e da secreção de PRL, enquanto que o GRF estimula quer a síntese quer a secreção de PRL.

O efeito da galanina sobre a actividade das células de PRL varia sazonalmente, estimulando a síntese durante o Inverno, mas sem efeito significativo sobre esta função na época do Verão. Curiosamente, este neuropeptídeo parece ter sempre uma acção inibitória sobre a secreção de PRL para o meio de cultura. Quando em conjunto com o GRF, o esquema de acção da galanina não é modificado, mas os níveis de secreção e síntese diminuem, sugerindo um antagonismo entre GRF e galanina.

A figura III.25 mostra esquematicamente as conclusões anteriores, não tendo sido incluída a acção conjunta da galanina e estradiol 17- β , uma vez os resultados da experiência são de certo modo inconclusivos, devido ao número reduzido de peixes analisados. Como conclusão preliminar, à semelhança do que parece acontecer com a GH, parece haver uma estimulação da síntese e secreção de PRL pelo estradiol eventualmente existente no plasma.

Esta estimulação é ainda aumentada quando as pituitárias são tratadas com galanina, o que sugere um sinergismo entre o 17- β -estradiol e a galanina ou um aumento da sensibilidade da pituitária ao efeito estimulador da galanina provocado pelo estrogéneo.

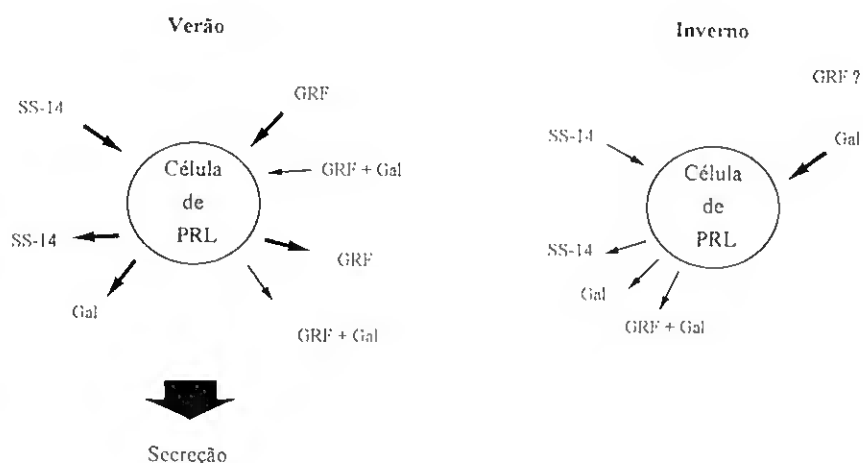


Figura III.25 - Representação esquemática dos principais factores de inibição (parte esquerda da figura) e de estimulação (parte direita da figura) da síntese e secreção de PRL. A espessura das setas está grosseiramente relacionada com a intensidade da estimulação ou inibição.

Parece assim poder concluir-se que o GRF é um factor hipotalâmico estimulador da síntese e secreção de PRL em *Sparus aurata* L. Pelo contrário, a SS-14 inibide significativamente a actividade das células de PRL. O neuropeptídeo galanina, além de interferir com o GRF (por antagonismo), tem um efeito directo sobre a actividade das células de PRL, estimulando a síntese e inibindo a secreção. O tratamento *in vivo* com estradiol-17- β não só parece aumentar a síntese e secreção de PRL em pituitárias incubadas *in vitro*, como também as torna mais sensíveis ao efeito estimulador da galanina.

A variação sazonal da intensidade da acção dos diferentes factores e do modelo de secreção e síntese nas pituitárias incubadas *in vitro*, faz supor existir também uma regulação ambiental da secreção e síntese de PRL, em que o fotoperíodo, o estado nutricional do animal ou a sua fase de maturação sexual provávelmente têm grande influência.

BIBLIOGRAFIA

Abad M. E., Agulleiro B., Rombout J. H. W. M. (1986) - An immunocytochemical and ultrastructural study of the endocrine pancreas of *Sparus auratus* L. *Gen. Comp. Endocr.* **64**, 1-12.

Abad M. E., Lozano M. T., Taverne-Thiele J. J., Rombout J. H. W. N. (1990) - Identification of two somatostatin-immunoreactive cell types in the principal islet of *Sparus auratus* L. (Teleostei) by immunogold staining. *Gen. Comp. Endocr.* **77**, 1-8.

Anderson Ø., Skibeli V., Gautvik K. M. (1989) - Purification and characterization of Atlantic salmon prolactin. *Gen. Comp. Endocr.* **73**, 354-360.

Baker I. B., Ingleton P. M. (1975) - Secretion of prolactin and growth hormone by teleost pituitaries *in vitro*; II. Effect of salt concentration during long-term organ culture. *J. Comp. Physiol.* **100**, 269-282.

Ball J. N. (1969) - Prolactin (fish prolactin or paralactin) and growth hormone. In "Fish Physiology", vol.2: Endocrine System (W. S. Hoar and D. J. Randall, Eds.) *Academic Press*, New York/London. pp 207-240.

Ball J. N. (1981) - Hypothalamic control of the pars distalis in fishes, amphibians and reptiles. *Gen. Comp. Endocr.* **44**, 135-170.

Ball J. N., Baker B. I. (1969) - The pituitary gland: Anatomy and Histophysiology. In "Fish Physiology", vol.2: Endocrine System (W. S. Hoar and D. J. Randall, Eds.) *Academic Press*, New York/London. pp 1-110.

Barry T. P., Grau E. G. (1986) - Estradiol-17 β and thyrotropin-releasing hormone stimulate prolactin release from the pituitary gland of a teleost fish *in vitro*. *Gen. Comp. Endocr.* **62**, 306-314.

Baskaran G., Sathyanesan A. G. (1992) - Tetrapod-like hypothalamo-hypophysial portal system in the teleost *Megalops cyprinoides* (Broussonet). *Gen. Comp. Endocr.* **86**, 211-219.

Batten T. F., Moons L., Cambré M., Vandesinde F. (1990) - Anatomical distribution of galanin-like immunoreactivity in the brain and pituitary of teleost fishes. *Neuroscience Letters.* **111**, 12-17.

Batten T. F., Young G., Ball J. N. (1983) - Secretory activity of *Poecilia latipinna* (Teleostei) pituitary *in vitro*: rostral pars distalis and proximal pars distalis. *Gen. Comp. Endocr.* **51**, 113-130.

Bonga S. E. W., Balm P. H. M., Flik G. (1988) - Control of prolactin secretion in the teleost *Oreochromis mossambicus*: effects of water acidification. *Gen. Comp. Endocr.* **72**, 1-12.

Botella A., DelVaux M., frexinos J., Bueno L. (1992) - Comparative effects of galanin on isolated smooth muscle cells from ileum in five mammalian species. *Life Sciences*. **50**, 1253-1261.

Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R. (1973) - A hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Science*. **179**, 77-79.

Bun N. G., Idler D. R., Burton M. (1980) - A comparison of prolactins from a marine, an estuarine and a freshwater teleost. *Gen. Comp. Endocr.* **42**, 141-146.

Burke W. H., Dennison P. T. (1980) - Prolactin and luteinizing hormone levels in female turkeys (*Meleagris gallopavo*) during photoinduced reproductive cycle and broodiness. *Gen. Comp. Endocr.* **41**, 92-100.

Cambré M. L., Verdonck W., Ollevier F., Vandesande F., Batten T. F. C., Kühn E. R. (1986) - Immunocytochemical identification and localization of the different cell types in the pituitary of the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocr.* **61**, 368-375.

Carvalho C. A. M. (1985) - Fisiologia Animal - Manual Teórico-Prático. Livraria Almedina, Coimbra. 336 pp.

Chang Y. S., Liu C. S., Huang F. L., Lo T. B. (1992) - The primary structures of growth hormones of three cyprinid species: bighead carp, silver carp and grass carp. *Gen. and Comp. Endocr.* **87**; 385-393.

Chester-Jones I., Ingleton P. M., Phillips J. G. (1987) - Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology. *Plenum Press*, New York.

Clarke W. C., Bern H. A. (1980) - Comparative endocrinology of prolactin. In "Hormonal proteins and peptides", **8** (Li C. H., ed.). *Academic Press*. New York: pp 105-197.

Conlon J. M., Agoston D. V., Thim L. (1985) - An elasmobranchian somatostatin: primary structure and tissue distribution in *Torpedo marmorata*. *Gen. Comp. Endocr.* **60**, 406-413.

Cook A. F., Peter R.E. (1984) - The effects of somatostatin on serum growth hormone levels in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocr.* **54**, 109-113.

Cook A. F., Wilson S. W., Peter R. E. (1983) - Development and validation of a carp growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocr.* **50**, 335-347.

Cornbrooks E. B., Parsons R. L. a) (1991) - Sexually dimorphic distribution of a galanin-like peptide in the central nervous system of the teleost fish *Poecilia latipinna*. *The Journal of Comparative Neurology*. **304**, 639-657.

- Cornbrooks E. B., Parsons R. L. b) (1991) - Source of sexually dimorphic galanin-like immunoreactive projections in the teleost fish *Poecilia latipinna*. *The Journal of Comparative Neurology*. **304**, 658-665.
- Dias Correia A. A., Dias Correia J. H. R. (1985) - Bioquímica Animal (2ª edição). *Fundação Calouste Gulbenkian*, Lisboa.
- Dubois M. P., Billard R., Breton B., Peter R. E. (1979) - Comparative distribution of somatostatin, LH-RH, neurophysin and α -endorphin in the rainbow trout: an immunocytochemical study. *Gen. Comp. Endocr.* **37**, 220-232.
- Dubourg P., Chamballe P., Olivereau M., Kah O. (1980) - Ultrastructure des cellules à prolactin de *Gambusia sp.* (poisson téléostéen) en eau douce, en eau désionisée et en milieu hypersaline. *Gen. Comp. Endocr.* **41**, 554-562.
- Eales J. G. (1990) - Thyroid function in poikilotherms. *Proceedings of the Eleventh International Symposium on Comparative Endocrinology*, Spain 1989. Wiley-Liss, New York. pp 415-420.
- Elbal M. T., Agulleiro B. (1986) - An immunocytochemical and ultrastructural study of endocrine cells in the gut of a teleost fish, *Sparus auratus* L. *Gen. Comp. Endocr.* **64**, 339-354.
- El Halawani M., Silsby J.L., Fehrer S. C., Behnke E. J. (1983) - Effects of estrogen and progesterone on serum prolactin and luteinizing hormone levels in ovariectomized turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Gen. Comp. Endocr.* **52**, 67-78.
- Elmqvist J. K., Kao A., Kuehl-Kovarik, Jacobson C. (1992) - Developmental profile of galanin binding sites in the mammalian brain. *Molecular and Cellular Neurosciences*. **4**, 354-365.
- Farmer S. W., Hayashida T., Papakoff H., Polenov A. L. (1980) - Characteristics of growth hormone isolated from sturgeon (*Acipenser guldenstadti*) pituitaries. *Endocrinology*. **108**, 377-381.
- Fryer J. N., Nishioka R. S., Bern H. A. (1979) - Somatostatin inhibition of teleost growth hormone secretion. *Gen. Comp. Endocr.* **39**, 244-246.
- Funkenstein B., Chen T. T., Power D. A., Cavari B. (1991) - Cloning and sequencing of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding cDNA. *Gene*. **103**, 243-247.
- Gabriel S. M., Washton D. L., Roncancio J. R. (1992) - Modulation of hypothalamic galanin gene expression by estrogen in peripubertal rats. *Peptides*. **13**, 801-806.
- Gonnet F., Prunet P., Tonon M. C., Dubourg P., Kah O., Vaudry H. (1988) - Effect of osmotic pressure on prolactin release in rainbow trout: *in vitro* studies. *Gen. Comp. Endocr.* **69**, 252-261.

- Grau E. G., Helms L. M. H. (1990) - The tilapia prolactin cell, twenty-five years of investigation. *Proceedings of the Eleventh International Symposium on Comparative Endocrinology*, Spain 1989. Wiley-Liss, New York. pp 534-540.
- Grau E. G., Nishioka R. S., Young G., Bern H. A. (1985) - Somatostatin-like immunoreactivity in the pituitary and brain of three teleost fish species: somatostatin as a potential regulator of prolactin cell function. *Gen. Comp. Endocr.* **59**, 350-357.
- Grau E. G., Prunet P., Gross T., Nishioka R. S., Bern H. A. (1984) - Bioassay for salmon prolactin using hypophysectomized *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocr.* **53**, 78-85.
- Hall T. R., Chadwick A. (1984) - Effects of synthetic mammalian thyrotrophin releasing hormone, somatostatin and dopamine on the secretion of prolactin and growth hormone from amphibian and reptilian pituitary glands incubated *in vitro*. *J. Endocr.* **102**, 175-180.
- Hall T. R., Harvey S., Chadwick A. (1984) - Oestradiol affects pituitary responsiveness *in vitro* in the domestic fowl. *Gen. Comp. Endocr.* **56**, 299-307.
- Hall T. R., Harvey S., Chadwick A. (1986) - Control of prolactin secretion in birds: a review. *Gen. Comp. Endocr.* **62**, 171-184.
- Hall T. R., Harvey S., Scanes C.G. (1986) - Review - Control of growth hormone secretion in the vertebrates: a comparative survey. *Comp. Biochem. Physiol.* **84A**, 2, 231-253.
- Hames B. D. (1981) - Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Hames, B. D. and Rickwood D. (eds). IRL Press Ltd., Oxford. 90pp.
- Harvey S., Foltzer-Jourdainne CH., Karmann H., Mialhe P. (1988) - Thyrotrophin-releasing hormone-induced growth hormone secretion in ducks: independence of peripheral plasma somatostatin, insulin and glucagon. *Gen. Comp. Endocr.* **70**, 374-381.
- Harvey S., Scanes C. G., Phillips J. G. (1985) - Growth hormone secretion in anaesthetized fowl. Refractoriness to repeated stimulation by human pancreatic growth hormone-releasing factor (hpGRF) or thyrotrophin releasing hormone (TRH). *Gen. Comp. Endocr.* **59**, 1-9.
- Healey E. G. (1957) - The Physiology of Fishes, vol. II, Behavior. Brown M. E. (ed.). *Academic Press Inc.*, New York. 526 pp.
- Helms L. M. H., Grau E. G., Shimoda S. K., Nishioka R. S., Bern H. A. (1987) - Studies on the regulation of growth hormone release from the proximal pars distalis of male tilapia, *Oreochromis mossambicus*, *in vitro*. *Gen. Comp. Endocr.* **65**, 48-55.

- Holmqvist B. I., Carlberg M. (1992) - Galanin receptors in the brain of a teleost: autoradiographic distribution of binding sites in the Atlantic salmon. *The Journal of Comparative Neurology*. **326**, 44-60.
- Holmqvist B. I., Ekström P. (1991) - Galanin-like immunoreactivity in the brain of teleosts: distribution and relation to substance P, vasotocin and isotocin in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *The Journal of Comparative Neurology*. **306**, 361-381.
- Hulting A., Meister B., Carlsson L., Hilding A., Isaksson O. (1991) - On the role of the peptide galanin in regulation of growth hormone secretion. *Acta Endocrinologica*. **125**, 518-525.
- Hyde J. F., Engle M. G., Maley B. E. (1991) - Colocalization of galanin and prolactin within secretory granules of anterior pituitary cells in estrogen-treated Fischer 344 rats. *Endocrinology*. **129**, 270-276.
- Ishii S., Yoneyama H., Inoue M., Yamamoto K., Kikuyama S. (1989) - Changes in plasma and pituitary levels of prolactin in the toad, *Bufo japonicus*, throughout the year with special reference to the breeding migration. *Gen. Comp. Endocr.* **74**, 365-372.
- Johnston L. R., Wigham T. (1990) - The effects of ions and hypothalamic factors on the *in vitro* activity of rainbow trout prolactin cells. *Gen. Comp. Endocr.* **79**, 253-260.
- Kawauchi H., Abe K., Takahashi A., Hirano T., Hasegawa S., Naito N., Nakai Y. (1983) - Isolation and properties of chum salmon prolactin. *Gen. Comp. Endocr.* **49**, 446-458.
- Kawauchi H., Yasuda A., Rand-Weaver M. (1990) - Evolution of prolactin and growth hormone family. *Proceedings of the Eleventh International Symposium on Comparative Endocrinology*, Spain 1989. Wiley-Liss, New York. pp 47-53.
- Kishida M., Hirano T., Kubota J., Hasegawa S., Kawauchi H., Yamaguchi K., Shirahata K. (1987) - Isolation of two forms of growth hormone secreted from eel pituitaries *in vitro*. *Gen. Comp. Endocr.* **65**, 478-488.
- Kühn E. R. (1990) - Hormonal control of peripheral monodeiodination in vertebrates. *Proceedings of the Eleventh International Symposium on Comparative Endocrinology*, Spain 1989. Wiley-Liss, New York. pp 421-426.
- Leatherland J. F., Farbridge K. J. (1992) - Chronic fasting reduces the response of the thyroid to growth hormone and TSH and alters the growth hormone-related changes in hepatic 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocr.* **87**, 342-353.
- Le Goff P., Weil C., Valotaire Y., Gonnard J. F., Prunet P. (1992) - Effect of somatostatin on prolactin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells in primary culture. *Journal of Molecular Endoc.* **9**, 137-146.

Light P., Denver R. J. (1988) - Effects of TRH on hormone release from pituitaries of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Gen. Comp. Endocr.* **70**, 355-362.

Lopez F. J., Negro-Vilar A. (1990) - Galanin stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments *in vitro*: involvement of a α -adrenergic mechanism. *Endocrinology*. **127**, 2431-2436.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Luo D., Mckeown B. A., Rivier J., Vale W. (1990) - *In vitro* responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatotrophs to carp growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin. *Gen. Comp. Endocr.* **80**, 288-298.

Marchant T. A., Dulka J. G., Peter R. E. (1989)- Relationship between serum growth hormone levels and the brain and pituitary content of immunoreactive somatostatin in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Gen. Comp. Endocr.* **73**, 458-468.

Marivoet S., Moons L., Vandesande F. (1988) - Localization of growth hormone releasing factor-like immunoreactivity in the hypothalamo-hypophyseal system of the frog (*Rana temporaria*) and the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocr.* **72**, 72-79.

Martins e Silva J. A., Geada H. M., Freire A.N. (1979) - Introdução à Bioquímica Médica. *Fundação Calouste Gulbenkian*, Lisboa. 401 pp.

Matsuda H., Nagahara T., Tsukuda M., Kadota T., Kusunoki T., Kishida R. (1993) - Distribution of galanin immunoreactive fibers in the mouse vomeronasal organ. *Biomedical Research*. **14**, 177-181.

Miki N., Shizume K. (1986) - Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Proceedings of the First International Symposium on the Pituitary Gland*, Tokyo, Japan November 14-17, 1984. Excerpta Medica, Amsterdam-New York-Oxford.

Miyajima K., Yasuda A., Swanson P., Kawauchi H., Cook H., Kaneko T., Peter R. E., Suzuki R., Hasegawa S., Hirano T. (1988) - Isolation and characterization of carp prolactin. *Gen. Comp. Endocr.* **70**, 407-417.

Morales J. C. (1983) - *Acuicultura Marina Animal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 670 pp.

Moons L., Batten T. F. C., Vandesande F. (1991) - Autoradiographic distribution of galanin binding sites in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Neuroscience Letters*. **123**, 49-52.

Moons L., Cambré M., Marivoet S., Batten T. F. C., Vanderhaeghen J.J., Ollevier F., Vandesande F. (1988) - Peptidergic innervation of the adrenocorticotropic

hormone (ACTH)- and growth hormone (GH)- producing cells in the pars distalis of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocr.* **72**, 171-180.

Moons L., Cambré M., Ollevier F., Vandesinde F. (1989) - Immunocytochemical demonstration of close relationships between neuropeptidergic nerve fibers and hormone-producing cell types in the adenohypophysis of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocr.* **73**, 270-283.

Muccioli G., Belussi G., Ghé C., Pagnini G., Carlo R. (1988) - Regional distribution and species variation of prolactin binding sites in the brain. *Gen. Comp. Endocr.* **69**, 399-405.

Newton B. W. (1993) - Galanin immunoreactivity in rat spinal lamina IX: emphasis on sexually dimorphic regions. *Peptides.* **14**, 955-969.

Nishioka R., Grau E. G., Bern H. A. (1985) - *In vitro* release of growth hormone from the pituitary gland of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocr.* **60**, 90-94.

Olcese J., Figueroa H., Hall T. R., Yurgens P., Kiebzak G., Meyer R., deVlaming V. (1981) - Effects of *para*-Chlorophenylalanine, a brain serotonin depletor, on pituitary cyclic AMP levels in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocr.* **43**, 462-466.

Olivereau M., Olivereau J. M. a) (1991) - Immunocytochemical localization of a galanin-like peptidergic system in the brain and pituitary of some teleost fish. *Histochemistry.* **96**, 343-354.

Olivereau M., Olivereau J. M. b) (1991) - Galanin-like immunoreactivity is increased in the brain of estradiol- and methyltestosterone-treated eels. *Histochemistry.* **96**, 487-497.

Pan J. X., Lechan R. M., Lin H. D., Sohn J., Reighlin S., Jackson I. M. D. (1985) - Multiple forms of human pancreatic growth hormone releasing factor-like immunoreactivity in teleost brain and pituitary. *Endocrinology.* **116**, 1663-1665.

Perez F. M., Malamed S., Scanes C. G. (1987) - Growth hormone secretion from chicken adenohypophyseal cells in primary culture: effects of human pancreatic growth hormone-releasing factor, thyrotropin-releasing hormone and somatostatin on growth hormone release. *Gen. Comp. Endocr.* **65**, 408-414.

Perez F. M., Malamed S., Scanes C. G. (1989) - Growth hormone release from chicken anterior pituitary cells in primary culture: TRH and hpGRF synergy, protein synthesis and cyclic adenosine 3' 5'- monophosphate. *Gen. Comp. Endocr.* **73**, 12-20.

Phillips L. S. (1981) - Nutrition, metabolism and growth. In "Current Endocrinology: Endocrine Control of Growth" (Daughaday W. H. and Avioli L. V., Eds.). Elsevier, New York/Oxford.

Pickering A. D.(1990) - Stress and the suppression of somatic growth in teleost fish. Progress in Comparative Endocrinology. *Proceedings of the Eleventh International Symposium on Comparative Endocrinology*, Spain 1989. Wiley-Liss, New York. pp 473-479.

Pitt R., Tsur O., Gordin H. (1977) - Cage culture of *Sparus aurata*. *Aquaculture*. **11**, 285-296.

Plisetskaya E. M.(1990) - Glucagon and related peptides (an overview). Progress in Comparative Endocrinology. *Proceedings of the Eleventh International Symposium on Comparative Endocrinology*, Spain 1989. Wiley-Liss, New York. pp 67-72.

Plisetskaya E. M., Pollock H. G., Rouse J. B., Hamilton J. W., Kimmel J. R., Andrews P. C., Gorbman A. (1986) - Characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) islet somatostatins. *Gen. Comp. Endocr.* **63**, 252-263.

Pottinger T. G., Prunet P., Pickering A. D.(1992) - The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocr.* **88**, 454-460.

Power D. M.(1992) - Immunocytochemical identification of growth hormone, prolactin and gonadotropin cells in the pituitary of male plaice (*Pleuronectes platessa*) during gonadal maturation. *Gen. Comp. Endocr.* **85**, 358-366.

Power D. M., Canario A. V. M.(1992) - Immunocytochemistry of somatotrophs, gonadotrophs, prolactin and adrenocorticotropin cells in larval sea bream (*Sparus auratus*) pituitaries. *Cell Tissue Res.* **269**, 341-346.

Prunet P., Avella M., Fostier A., Björnsson B. T., Boeuf G., Haux C. (1990) - Roles of prolactin in salmonids. *Proceedings of the Eleventh International Symposium on Comparative Endocrinology*, Spain 1989. Wiley-Liss, New York. pp 547-552.

Prunet P., Houdebine L.M. (1984) - Purification and biological characterization of chinook salmon prolactin. *Gen. Comp. Endocr.* **53**, 49-57.

Quesada J., Lozano M. T., Ortega A. and Agulleiro B.(1988) - Immunocytochemical and ultrastructural characterization of the cell types in the adenohypophysis of *Sparus aurata* L. *Gen. Comp. Endocr.* **72**, 209-225.

Rand-Weaver M., Noso T., Kawauchi H. (1991) - The complete aminoacid sequences of two variants of growth hormone from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Gen. Comp. Endocr.* **81**, 39-50.

Rivas R. J., Nishioka R. S., Bern H. A. (1986) - *In vitro* effects of somatostatin and urotensin II on prolactin and growth hormone secretion in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocr.* **63**, 245-251.

Rubin D. A. and Specker J. L.(1992) - *In vitro* effects of homologous prolactins on testosterone production by testes of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocr.* **87**, 189-196.

Scanes C. G., Jallageas M., Assenmacher I. (1980) - Seasonal variations in the circulating concentrations of growth hormone in male Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and teal (*Anas crecca*); correlations with thyroidal function. *Gen. Comp. Endocr.* **41**, 76-79.

Scanes C. G., Harvey S. (1984) - Stimulation of growth hormone secretion by human pancreatic growth-hormone-releasing factor and thyrotrophin-releasing hormone in anaesthetized chickens. *Gen. Comp. Endocr.* **56**, 198-203.

Scheidtmann K. H.(1989) - Immunological detection of proteins of known sequence. In "Protein Structure (Practical approach series)", Creighton T. E.(editor). Information Press Ltd., Oxford, England, 353 pp.

See Y. P., Jackowski G. (1990) - Protein structure - a practical approach. Edited by T. E. Creighton. IRL Press at Oxford University Press, England, pp 1-20.

Simões J. M. C.(1984) - Fisiologia da Reprodução dos Ungulados Domésticos. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 623 pp.

Skibeli V., Anderson Ø., Gautvik K. M. (1990) - Purification and characterization of Atlantic salmon growth hormone and evidence for gharge heterogeneity. *Gen. Comp. Endocr.* **80**, 333-344.

Specker J., Kishida M., Huang L., King D., Nagahama Y., Ueda H. and Anderson T. R.(1993) - Immunocytochemical and immunogold localization of two prolactin isoforms in the same pituitary cells and in the same granules in the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocr.* **89**, 28-38.

Suzuki R., Kishida M., Ogasawara T., Hasegawa S., Hirano T. (1987) - Prolactin and growth hormone secretion during long-term incubation of the pituitary pars distalis of mature chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocr.* **68**, 76-81.

Torsello A., Vrontakis M.E., Schroedter I.C., Vuille J., Ikejiani C. e Friesen H.G. (1992) - Steroids and tissue-specific modulation of galanin gene expression in the male rat reproductive system. *Endocrinology.* **130**, 3301-3306.

Wagner G. F., Fargher R. C., Brown J. C., McKeown B. A. (1985) - Further characterization of growth hormone from the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Gen. Comp. Endocr.* **60**, 27-34.

Wagner G. F., McKeown B. A. (1983) - The imunocytochemical localization of pituitary somatotrops in the genus *Oncorhynchus* using an antiserum to growth hormone of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Cell Tissue Res.* **243**, 693-697.

Weatherley A. H., Gill H. S. 1987) - The Biology of Fish Growth. *Academic Press Inc.*, San Diego.

Wigham T., Batten T. F. C. (1984) - *In vitro* effects of the hypothalamic peptides TRH and somatostatin on prolactin and growth hormone cell activity in the pituitary of *Poecilia latipinna* incubated *in vitro*. I. An electrophoretic study. *Gen. Comp. Endocr.* **55**, 444-449.

Wigham T., Nishioka R. S., Bern H. A. (1977) - Factors affecting *in vitro* activity of prolactin cells in the euryhaline teleost *Sarotherodon mossambicus* (*Tilapia mossambica*). *Gen. Comp. Endocr.* **32**, 120-131.

Williams A. J., Wigham T. (1992) - The effects of oestradiol, somatostatin and TRH on prolactin release by rainbow trout pituitaries. In Abstracts of the Papers presented at the fifteenth Conference of European Endocrinologists, Belgium, 1990 (Henderson I. W. and Deacon C. F., editors). *Gen. Comp. Endocr.* **82**, 215-328.

Wilson M. E., Gordon T. P., Tanner J. M. (1993) - Constant low dose oestradiol replacement accelerates skeletal maturation and growth in ovariectomized adolescent rhesus monkeys. *Journal of Endocrinology.* **137**, 519-527.

Wolfbauer C., Skofitsch G. (1989) - Immunohistochemical localization of galanin and calcitonin gene-related peptide in the brain of the frog *Rana temporaria*. Abstracts of papers presented at the 14th Conference of European Comparative Endocrinologists. *Gen. Comp. Endocr.* **74**, 295.

Wolfbauer C., Skofitsch G. (1989) - Immunohistochemical localization of galanin and calcitonin gene-related peptide in the brain of the frog *Salmo gairdneri*. Abstracts of papers presented at the 14th Conference of European Comparative Endocrinologists. *Gen. Comp. Endocr.* **74**, 295.

Wynick D., Hammond P. J., Akinsanya K. O., Bloom S. R. (1993) - Galanin regulates basal and oestrogen-stimulated lactotroph function. *Nature.* **364**, 529-532.

Yada T., Hirano T. (1992) - Inhibition of growth hormone synthesis by somatostatin in cultured pituitary of rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B*, **162**, 575-580.

Yamaguchi K., King D. S., Specker J. L., Nishioka R. S., Hirano T., Bern H. A. (1991) - Amino acid sequence of growth hormone isolated from medium of incubated pituitary glands of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocr.* **81**, 323-331.

Yamaguchi K., Yasuda A., Kishida M., Hirano T., Sano H., Kawauchi H. (1987) - Primary structure of eel (*Anguilla japonica*) growth hormone. *Gen. Comp. Endocr.* **66**, 447-453.

Yasuda A., Miyazima K., Kawauchi H., Peter R. E., Lin H., Yamaguchi K., Sano H. (1987) - Primary structure of common carp prolactins. *Gen. Comp. Endocr.* **66**, 280-290.

