MARIA ARMANDA REIS HENRIQUES

ESTUDO DO PADRÃO DE ESTERÓIDES EM *Mytilus* sp.

RELAÇÃO COM O CICLO REPRODUTIVO E COM A REGULAÇÃO HIDROMINERAL

PORTO

1987

MARIA ARMANDA REIS HENRIQUES

Assistente do Instituto de Ciências Biomédicas
"Abel Salazar" da Universidade do Porto

ESTUDO DO PADRÃO DE ESTERÓIDES EM *Mytilus* sp.

RELAÇÃO COM O CICLO REPRODUTIVO E COM A REGULAÇÃO HIDROMINERAL

Dissertação de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Especialidade Fisiologia, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas "Abel Salazar" da Universidade do Porto

PORTO
1987

À memória de meu Pai,
à minha Mãe e à Ana

AGRADECIMENTOS

É meu dever começar por uma palavra de sincero reconhecimento a todos os que de algum modo contribuiram para a realização deste trabalho e em especial:

Ao Prof. Carvalho Guerra, que tão amavelmente aceitou ser o meu orientador, e com quem iniciei, após a licenciatura, a minha actividade científica no Centro de Estudos de Bioquímica do Instituto de Alta Cultura, e a quem desejo manifestar a minha profunda gratidão.

Ao Prof. João Coimbra, responsável pelo Sector de Fisiologia, agradeço vivamente o apoio constante na execução deste trabalho e a confiança que sempre me incutiu. A sua orientação científica e, sobretudo, a sua amizade, não isenta por vezes de discussão calorosa mas nem por isso alterada, foram fundamentais para este objectivo.

Ao Prof. G. Adessi e à sua equipa de colaboradores no INSERM de Besançon estou reconhecida pelo seu amável acolhimento e pelas facilidades concedidas no início do trabalho experimental.

À Engª. Técnica Laurinda Silva estou profundamente reconhecida pela exemplar colaboração técnica desde o início deste trabalho, bem como pela execução de todo o processamento de texto, e ainda pela dedicação e amizade que me tem demonstrado ao longo destes anos.

à Drª. Ana Teia dos Santos, colaboradora do INIP de Aveiro, por todas as facilidades concedidas na obtenção dos animais.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela concessão de facilidades na utilização do equipamento de cromatografia, e em particular à Drª. Maria Adelina Macedo pela ajuda técnica.

Ao Serviço de Endocrinologia do Hospital Geral de Santo António, e em especial à Drª. Maria Carla Cunha, pela sua colaboração nos doseamentos radioimunológicos.

No Sector de Fisiologia quero agradecer ao Dr. Andrade Ferreira pela ajuda prestada nas técnicas de espectrofotometria de absorção atómica, à Drª. Augusta Coimbra pela leccionação de algumas das minhas aulas práticas, e ao Dr. Jorge Machado pela medição dos potenciais na fase inicial deste trabalho.

Não quero deixar de agradecer também ao Sr. Carlos Rosa a disponibilidade e o interesse que sempre manifestou em todas as deslocações para colheita de animais.

ÍNDICE

CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DE ESTERÓIDES ENDÓGENOS EM *Mytilus* sp.

INTRODUÇÃO 2

MATERIAIS E MÉTODOS 6

1 - Animais 6
2 - Dissecação dos animais 6
3 - Obtenção dos lípidos totais 6
4 - Extracção dos esteróides 7
5 - Separação dos esteróides neutros e dos estrogénios 8
6 - Cromatografia em resina troca iónica DOWEX AG1-X2 8
7 - Cromatografia em Camada Fina 10
8 - Cromatografia Gás-Líquido (GLC) 12
9 - Espectrometria de Massa 13
10 - Radioimunoensaio (RIA) 14

RESULTADOS 17

DISCUSSÃO 29

BIBLIOGRAFIA 34

CAPÍTULO II - QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTERÓIDES ENDÓGENOS EM *Mytilus* sp. E SUA CORRELAÇÃO COM AS FASES DO CICLO REPRODUTIVO

INTRODUÇÃO 41

MATERIAIS E MÉTODOS 51

A - Técnicas efectuadas no animal inteiro

1 - Animais 51
2 - Dissecação dos animais 51
3 - Obtenção dos lípidos totais 51
4 - Extracção dos esteróides 52
5 - Separação dos esteróides neutros e dos estrogénios
Cromatografia em resina troca iónica DOWEX AG1-X2 52
6 - Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) 53
7 - Cromatografia Gás-Líquido (GLC) 55
8 - Exame histológico. Determinação do índice da gónada 56

B - Ténicas efectuadas em mantos isolados

1 - Animais 59
2 - Dissecação dos animais 59
3 - Doseamento das proteínas 59
4 - Determinação dos lípidos totais 59
5 - Extracção dos esteróides 60
6 - Doseamento da progesterona, testosterona e estradiol por radioimunoensaio (R.I.A.) 60

RESULTADOS 64

1 - Ciclo sexual - índice da gónada 68
2 - Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)
Cromatografia Gás-Líquido (GLC) 81
3 - Resultados obtidos nos mantos de *Mytilus* 93

DISCUSSÃO 98

BIBLIOGRAFIA 106

CAPÍTULO III - ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE DO MANTO DE *Mytilus* sp. AO SÓDIO E AO MANITOL EM FUNÇÃO DAS FASES DO CICLO REPRODUTIVO

INTRODUÇÃO 118

MATERIAIS E MÉTODOS 125

A - Estudo cinético dos movimentos de sódio e manitol 125

1 - Medida dos fluxos unidireccionais 127
2 - Medida dos fluxos de descarga ("wash-out") 131
3 - Cálculo do tamanho dos compartimentos 133

B - Tratamento por Espectrofotometria de Absorção Atómica (E.A.A.)

1 - Tratamento das amostras 134
2 - Doseamento dos iões 134

C - Medida do grau de hidratação dos tecidos 135
D - Medida das diferenças de potencial 135
E - Cálculos e estatística 136

RESULTADOS 138

1 - Medição dos potenciais transepiteliais 138
2 - Valores dos fluxos unidireccionais de sódio e manitol 139
3 - Fluxos de descarga de cálcio, manitol e sódio 144
4 - Variação do peso fresco por unidade de superfície dos mantos em função das fases do ciclo reprodutivo 146
5 - Variação dos coeficientes de transferência em função do índice da espessura como indicador da fase 148
6 - Concentração do sódio, potássio e cálcio nos tecidos dos animais estudados 153
7 - Grau de hidratação dos tecidos 155

DISCUSSÃO 158

BIBLIOGRAFIA 165

CAPÍTULO IV - ACÇÃO *in vitro* DA PROGESTERONA E ESTROGÉNIOS SOBRE A PERMEABILIDADE DO MANTO DE *Mytilus* sp.

INTRODUÇÃO 173

MATERIAIS E MÉTODOS 179

RESULTADOS 181

A - Efeito da progesterona

1 - Sódio 181

2 - Manitol 182

B - Efeito dos estrogénios

1 - Sódio 184

2 - Manitol 185

DISCUSSÃO 188

BIBLIOGRAFIA 192

CONCLUSÕES GERAIS 197

INTRODUÇÃO

A ocorrência e acção das hormonas esteróides foi há largos anos bem definida nos mamíferos, especialmente no Homem. Mais tarde alguns investigadores tornaram estes estudos extensivos aos invertebrados, de que são exemplo os trabalhos conduzidos por Sandor (1972) e Chester Jones (1976), os quais afirmaram que os esteróides desempenhavam nestes organismos um papel hormonal e uma acção biológica definida.

De entre os invertebrados tem sido largamente estudada a estrela-do-mar, *Asterias rubens*, tendo Schoenmakers et al. (1977) posto em evidência a existência nos ovários de células características produtoras de esteróides. O mesmo autor (1979) demonstrou a formação de pregnenolona e progesterona pelos ovários e ceco pilórico deste equinoderme, a partir do 1,2-^{3}H-colesterol como precursor. Ainda dentro do mesmo campo de trabalhos Schoenmakers e Voogt (1980 e 1981) estabeleceram a biossíntese de esteróides *in vitro* a partir da progesterona e da androstenediona.

Nos insectos, Karlson (1974) isolou a ecdisona (hormona da muda) e os seus homólogos ecdisteróides da glândula protoráxica de indivíduos de diversos grupos, demonstrando que estes compostos, além de apresentarem uma estrutura esteróide, podiam ser biossintetizados a partir do colesterol, tal como acontecia nos vertebrados com as hormonas esteróides em C_{21}, C_{19} e C_{18}.

Mais recentemente, Mechoulan et al. (1983) identificaram por cromatografia gasosa-espectrometria de massa a presença em 5 ordens de insectos dos estrogénios estradiol e estriol, bem como dos androgénios, levantando a hipótese de que a presença destes esteróides significaria que as hormonas sexuais dos vertebrados possuem uma história evolutiva antiga.

Logo depois, De Clerck et al. (1984) evidenciaram a presença de onze esteróides não ecdisteróides na hemolinfa do insecto *Sarcophaga bullata*.

Nos moluscos já tinha sido detectada a presença de algumas hormonas esteróides como, por exemplo, a progesterona nas gónadas do bivalve *Pecten maximus*, por Saliot e Barbier (1971) e muito antes, a presença de estrogénios nos ovários de um outro molusco marinho, *Mactra solidissima*, por Hagerman et al. (1957), sem no entanto estabelecerem uma prova clara da sua acção hormonal.

Joosse (1978), ao fazer uma revisão dos trabalhos publicados até então sobre as características do sistema neurossecretor dos gastrópodes e cefalópodes, salientou a acção de várias hormonas implicadas no controlo da reprodução dos gastrópodes. Nas fêmeas a hormona dos corpos dorsais estimulava a vitelogénese nos oócitos (Geraerts, 1976) bem como o crescimento (Geraerts, 1976a) e a diferenciação celular (Geraerts e Algera, 1972, 1976). Nos machos era clara a influência androgénica dos gânglios cerebrais: a diferenciação e manutenção das células masculinas estava dependente deste factor (Guyard, 1971). Nos cefalópodes a hormona da glândula óptica estimulava vários aspectos da actividade sexual no macho e na fêmea.

Mas os estudos *in vivo* e *in vitro* continuaram a ser feitos, entre outros por Bardon et al. (1971), Gottfried e Dorfman (1970) e De Longcamp et al. (1974), que demonstraram a existência da síntese de esteróides em moluscos usando precursores radioactivos.

No entanto uma grande ajuda foi dada pelo advento de novas técnicas analíticas, cada vez mais precisas, como a cromatografia gás-líquido associada à espectrometria de massa, que permitiram detectar pequenas quantidades de esteróides na hemolinfa e nos orgãos reprodutores de invertebrados, que embora ainda não esclarecessem totalmente quanto à sua acção fisiológica, os colocavam como mensageiros naturais nos invertebrados.

A etapa seguinte consistiu na demonstração da presença, nos invertebrados, de um tecido ou orgão homólogo do tecido adrenal dos cordados.

As experiências iniciais utilizaram métodos clássicos da Endocrinologia, como: a castração, o enxerto de orgãos e a administração de substâncias que se sabia estimularem ou deprimirem a função endócrina

da glândula. São exemplos destes trabalhos a castração em caracóis, que reduzia fortemente a actividade secretora das glândulas multífides (Gomot, 1977), e as injecções intramusculares de propionato de testosterona, de benzoato de estradiol e de progesterona, em solução oleosa, realizadas por Aubry (1962) em *Lymnaea stagnalis* e *Helix pomatia*. Segundo este autor a testosterona provocou a espermatogénese e inibiu a oogénese, enquanto que o estradiol estimulou a parte feminina e travou o desenvolvimento da parte masculina e a progesterona foi activa nas duas.

Noutro gastrópode, *Ariolimax californicus*, no qual foi feita a ablação dos tentáculos ópticos, a espermatogénese foi induzida na glândula hermafrodita num estado primário de desenvolvimento masculino. Este efeito era duplicado pela administração da desidroepiandrosterona e da 11-cetotestosterona em animais normais, enquanto a metopirona, um inibidor da hidroxilação dos esteróides, antagonizava o efeito destes compostos (Aubry, 1962 e Lehoux e Sandor, 1970).

Para além dos estudos referidos, também a presença de sistemas enzimáticos, envolvidos na biossíntese de hormonas sexuais dos vertebrados, apontava para a existência de um sistema hormonal com fortes analogias com o dos grupos mais evoluídos. De entre os sistemas enzimáticos postos em evidência salientamos o complexo 3β-hidroxiesteróide desidrogenase - $\Delta^{5,4}$-isomerase, a $C_{17,21}$-liase, a 17β-hidroxiesteróide desidrogenase, bem como um número de hidroxilases, entre as quais a 17α-hidroxilase, estudados por De Longcamp et al. (1970 e 1974) em *Mytilus edulis*, um molusco lamelibrânquio, por Bardon et al. (1971) e Di Prisco e Fulgheri (1975) em *Crepidula* e *Aplysia*, dois moluscos gastrópodes marinhos.

Os esteróides, incluindo o colesterol, são biossintetizados *de novo* pela maioria dos invertebrados, com excepção para alguns artrópodes incluindo os insectos, os quais necessitam deste esteróide como suplemento da dieta.

Gottfried e Dorfman (1970), após a administração num gastrópode de acetato marcado com ^{14}C, puderam provar a incorporação deste no colesterol. Teshima e Kanazawa (1973), em trabalhos realizados em moluscos

de géneros diferentes, demonstraram a capacidade destes animais para sintetizarem esteróides a partir do mevalonato marcado em ^{14}C, entre os quais o colesterol.

Do exposto pode-se concluir que, se é ainda difícil afirmar com segurança qual o papel desempenhado pelos esteróides nos invertebrados, pode no entanto esperar-se que estes compostos, alguns deles já encontrados nos orgãos reprodutores dos invertebrados, desempenhem nestes animais um papel activo no ciclo reprodutivo.

O termo esteróide será usado por nós para denominar os compostos químicos em C_{21}, C_{19} e C_{18}, com o núcleo do ciclopentanoperidrofenantreno, e que apresentam nos vertebrados uma função hormonal bem definida na reprodução.

O mexilhão, *Mytilus*, foi escolhido como material de estudo por duas razões: primeira, porque nos pareceu ser este o grupo, dentro dos moluscos, o menos estudado e o que apresentava resultados mais contraditórios - talvez por apresentar uma composição em esteróides bastante complexa; segunda, porque tivemos acesso a animais de cultura, o que nos garantia à partida trabalhar com um lote de animais homogéneos no respeitante a idades e condições ambientais.

Com este trabalho pretendemos, numa primeira fase, proceder ao isolamento e caracterização de alguns esteróides endógenos em *Mytilus*, que se supunha estarem presentes na gónada, uma vez que havia sido demonstrada a presença das enzimas intervenientes na sua síntese e metabolismo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - ANIMAIS

Foram usadas nesta parte do trabalho duas amostras de *Mytilus* obtidas no mês de Dezembro de 1982 (Amostra I) e Fevereiro de 1983 (Amostra II). Os animais foram colhidos de uma jangada situada na Ria de Aveiro, Costa Nova (40° 38' S, 8° 45' W), que se encontrava a poucos metros da margem. A fixação das larvas às cordas da jangada tinha-se dado na Primavera de 1981. Após a colheita, os animais foram imediatamente transportados para o laboratório, colocados num aquário com água salgada (num período máximo de 24 horas), à temperatura ambiente, com arejamento e sem adição de comida.

2 - DISSECAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais considerados sexualmente maduros (com um comprimento de concha situado entre 50 e 70 mm) foram separados em dois lotes de 15 a 20 animais cada, segundo o sexo. Para tal foram cortados os músculos adutores, anterior e posterior, tendo sido rejeitados os animais que não ofereciam uma forte resistência à abertura das conchas. Foi feito um esfregaço numa lâmina com um pequeno fragmento da gónada (manto) e de seguida observado ao microscópio óptico, em ampliação média. A identificação das fêmeas foi feita pela presença de oócitos, e a dos machos pela presença de espermatócitos e espermatozóides, facilmente identificáveis.

Todos os animais onde foi detectada a presença de parasitas foram eliminados.

3 - OBTENÇÃO DOS LIPIDOS TOTAIS

Os animais, machos e fêmeas, foram pesados, colocados em placas de

Petri e em seguida liofilizados. Depois de novamente pesados, para a obtenção do peso seco, foi calculada a percentagem de água.

Seguiu-se a extracção dos lípidos totais com a mistura de clorofórmio, metanol e água na proporção de 1:2:0,8, à temperatura ambiente e segundo o método de Bligh e Dyer (1959). Após a separação das fases clorofórmica e aquosa em ampola de decantação, os extractos clorofórmicos correspondentes aos lípidos totais, depois de secos com Na_2SO_4, foram evaporados a extracto seco, a pressão reduzida.

Todo o material de vidro usado no trabalho foi previamente passado pela mistura cromo-sulfúrica. A água utilizada, que por comodidade se passa a designar somente por água destilada, era destilada e desionizada.

4 - EXTRACÇÃO DOS ESTERÓIDES

O extracto lipídico foi homogeneizado com pequenos volumes de metanol a 80% (v/v), até um total de 120 ml, e os extractos metanólicos obtidos foram distribuídos por tubos de centrífuga e guardados durante 48 horas à temperatura de -20 °C. Ao fim deste tempo foram centrifugados, numa centrífuga SORVALL GLC1 com rotor basculante, a 2 000 r.p.m. durante 10 minutos, também a temperatura próxima daquela, e os sobrenadantes separados do precipitado dos lípidos, e guardados. Os precipitados foram lavados com um pequeno volume de metanol a 80%, centrifugados nas mesmas condições e a fracção metanólica foi adicionada à obtida anteriormente. A totalidade dos extractos foi evaporada a baixa pressão, à temperatura de 50 °C, e a fracção aquosa resultante evaporada num banho de areia, à mesma temperatura e em atmosfera de azoto.

Os extractos secos foram novamente deslipidificados segundo a técnica atrás descrita.

Segundo Adlercreutz et al. (1978) o tratamento das amostras (no caso a bílis) com metanol a 80% e a uma temperatura baixa permitia uma separação muito eficiente dos esteróides, tendo sido posteriormente usado o mesmo método (Adlercreutz e Järvenpää, 1982) para a separação dos estrogénios nas fezes.

5 - SEPARAÇÃO DOS ESTERÓIDES NEUTROS E DOS ESTROGÉNIOS

Obtido o extracto metanólico, os esteróides neutros foram separados dos esteróides aromáticos (estrogénios). Com este objectivo o extracto metanólico foi suspenso em 5 ml de água destilada, e de seguida foi feita a extracção dos esteróides da suspensão aquosa, com 4x10 ml de clorofórmio.

Para se calcular o rendimento da extracção foram adicionados à suspensão aquosa 100 µl da mistura ^{3}H-androstenediona e ^{14}C-estradiol (correspondente a 1 100 000 d.p.m. para o ^{3}H e 30 000 d.p.m. para o ^{14}C).

Os quatro extractos clorofórmicos foram então reunidos, evaporados à secura a pressão reduzida, e retomados com 1 ml de metanol.

Desta solução metanólica foi retirada uma alíquota que foi contada em 15 ml de picoflúor 15, num analisador de cintilação líquida PACKARD TRI-CARB 3375. O rendimento obtido foi de 65% para os esteróides neutros (^{3}H-androstenediona) e 85% para os estrogénios (^{14}C-estradiol).

6 - CROMATOGRAFIA EM RESINA TROCA IÓNICA DOWEX AG1-X2

A purificação da fracção esteróide existente no extracto biológico, sobretudo quando, como neste caso, os esteróides se encontravam numa fraca concentração, colocou desde logo um duplo problema: por um lado, encontrar um método altamente resolutivo que permitisse isolar os esteróides de um extracto bruto, e por outro, utilizar uma técnica de quantificação de grande sensibilidade e de estreita especificidade; isto porque havia um número elevado de substâncias interferentes que teriam de ser, na sua maior parte, eliminadas.

Um grande avanço na purificação dos extractos biológicos foi dado com a utilização em cromatografia da resina troca iónica de aniões DOWEX AG1-X2, sob a forma de cloreto (Eberlein, 1969), para o doseamento da estrona e do estradiol. Adessi *et al.* (1975) e Järvenpää *et al.* (1979) fizeram largo uso desta técnica para o doseamento de pequenas

quantidades de estrogénios na urina e nas fezes.

Mas foi com a utilização desta resina, sob a forma de bicarbonato (Adlercreutz e Järvenpää, 1982), que se obtiveram melhores resultados de separação e, sobretudo, um avanço na conservação da resina depois de tratada. Optou-se assim por utilizá-la na forma de bicarbonato.

Para este efeito partiu-se de uma certa quantidade de resina DOWEX AG1-X2 (Sigma) na forma de cloreto, de 200 a 400 mesh, e que foi lavada: duas vezes com 2 volumes (de cada vez) de água destilada; três vezes com 2 volumes de metanol e três vezes com 2 volumes de água destilada. Cada operação de lavagem consistiu na agitação da resina (10 min), seguida de decantação (igual período de tempo) e por fim da aspiração do sobrenadante, que continha as partículas mais finas.

A aproximadamente 40 ml de resina foram adicionados 120 ml de bicarbonato de sódio 0,5 M. Após agitação (15 min) e decantação por igual período de tempo, o sobrenadante foi aspirado. Esta operação foi efectuada uma segunda vez, após o que a resina foi lavada com 120 ml de água destilada e duas vezes com 200 ml de metanol. Posta em suspensão num terceiro banho de metanol foi guardada a +4 °C, conservando a sua actividade durante um máximo de 15 dias.

Para a preparação da coluna, a resina foi colocada numa altura de 4 cm, numa coluna de vidro de 1×12 cm equipada na parte superior com um reservatório de 50 ml de capacidade, e fechada na parte inferior com vidro "fritté" nº 1. Imediatamente antes da sua utilização, a coluna foi lavada com 2 ml de metanol.

O extracto a analisar foi introduzido na coluna com 3×1 ml de metanol e a eluição foi feita com 15 ml de metanol, que arrastou os esteróides neutros, seguida de 25 ml de metanol a 80%, que arrastou os estrogénios.

Cada lote de resina preparada foi "standardizada" com a introdução na coluna de 20 µg de testosterona e 20 µg de estradiol, seguida da eluição. A percentagem de recuperação quer para a testosterona - eluída com metanol -, quer para o estradiol - eluído com metanol a 80% -, foi calculada por espectrofotometria de U.V., respectivamente a 240 e 280 nm, dando um valor próximo de 100%, e por cromatografia gás-

-líquido, onde o rendimento foi de cerca de 80%.

7 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

As quatro fracções metanólicas, duas para os machos e duas para as fêmeas, foram levadas a extracto seco e submetidas a uma separação dos componentes por cromatografia de camada fina.

Usaram-se cromatofolhas de alumínio (Merck) de 20×20 cm, com a espessura do gel de sílica de 0,25 cm, e sem indicador de fluorescência. Todas as placas usadas foram previamente lavadas em acetona.

Os padrões que serviram de referência para os esteróides neutros, foram:

C_{21} - Progesterona (4-pregnene-3,20-diona)
C_{19} - Androstenediona (4-androstene-3,17-diona)
C_{19} - Testosterona (4-androstene-17β-ol-3-ona)
C_{19} - Diidrotestosterona (5α-androstane-17β-ol-3-ona)
C_{19} - Androstanediol (5α-androstane-3,17β-diol
C_{19} - Androsterona (5α-androstane-3α-ol-17-ona)

e para os estrogénios:

C_{18} - 17β-estradiol (1,3,5(10)estratriene-3,17β-diol)
C_{18} - Estrona (1,3,5(10)estratriene-3-ol-17-ona)
C_{18} - Estriol (1,3,5(10)estratriene-3,16α,17β-triol)

Como se pode verificar pela figura 1 a placa foi dividida em 3 partes iguais: nas partes I e III foi colocada a mistura dos padrões. A amostra a estudar, que se encontrava sob forma de extracto seco, foi retomada por pequenos volumes de etanol e depositada, gota a gota, na parte central da placa (II).

As placas foram desenvolvidas em câmaras de vidro saturadas com os seguintes sistemas de solventes:

sistema A - diclorometano-acetato de etilo-metanol (85:15:1, v/v)
Para os esteróides neutros. Desenvolvida 3 vezes.

sistema B - ciclohexano-acetato de etilo (50:50, v/v)

Para os estrogénios. Desenvolvida 2 vezes.

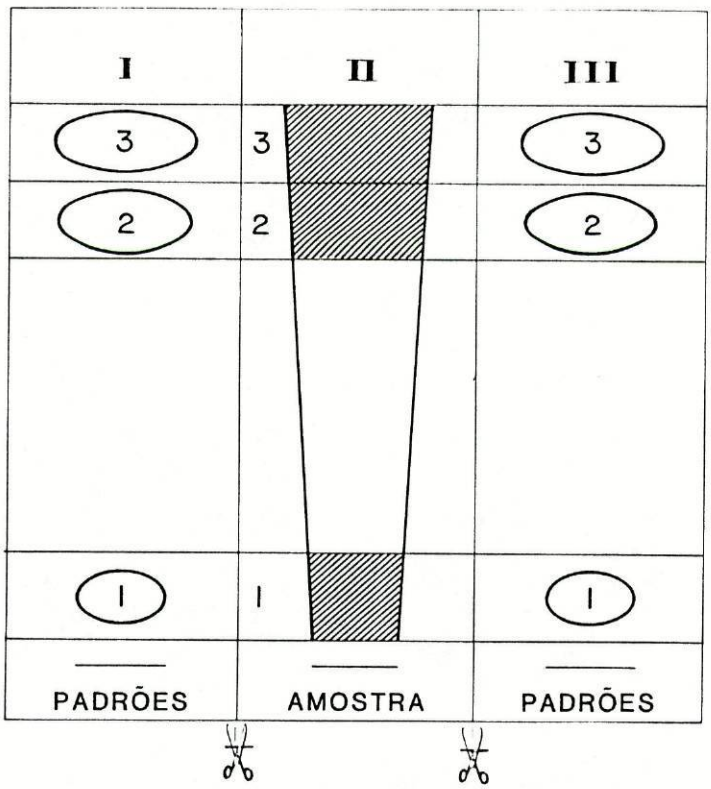


FIG. 1 - Esquema da deposição e desenvolvimento dos padrões e das amostras em placa de gel de sílica

Para a localização das manchas, a placa foi cortada como indica a figura 1 e as partes I e III foram reveladas da seguinte maneira: nos esteróides em C_{21} e C_{19}, por pulverização com H_2SO_4 a 60% em etanol a 40%, e depois colocadas na estufa a 90 °C, durante 10 min; nos estrogénios, a revelação das manchas foi obtida por pulverização com reagente de Folin, seguida de exposição aos vapores de NH_3.

Pelas figuras 2 e 3 pode-se ver as manchas correspondentes aos padrões, de acordo com as distâncias de migração na placa.

As placas foram reconstruídas e traçada no gel de sílica a localização dos componentes da amostra que tinham migrado a uma altura idêntica à dos padrões correspondentes. Uma vez marcada a zona a recuperar, o suporte de gel de sílica foi raspado e extraído com 2×2 ml de acetato de etilo e 2×2 ml de etanol, que foram recolhidos no mesmo tubo e evaporados à secura num banho a 37 °C e em atmosfera de azoto.

A

(1) Estrona
(2) 17β-Estradiol
(3) Estriol

B

(1) Progesterona
(2) Δ^4-androstenediona
(3) Diidrotestosterona
(4) Androsterona
(5) Testosterona
(6) Androstanediol

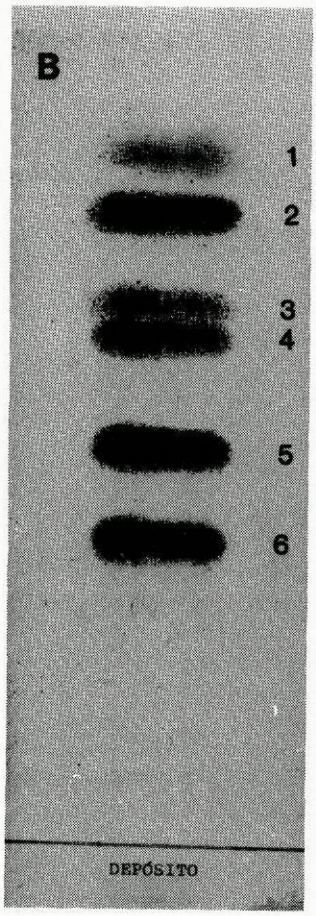


FIG. 2 - Separação dos estrogénios por cromatografia de camada fina

FIG. 3 - Separação dos esteróides neutros por cromatografia de camada fina

8 - CROMATOGRAFIA GÁS-LIQUIDO (GLC)

Os esteróides com grupos hidroxilo foram transformados em éteres trimetilsililados. Para tal foram adicionados a cada tubo, contendo o extracto seco a analisar, 100 µl da mistura de sililação: bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS) na proporção de 99 µl de BSTFA e 1 µl de TMCS - para a androsterona, diidrotestosterona e androstanediol -, e 80 µl de BSTFA e 20 µl de TMCS - para a testosterona, 17β-estradiol, estrona e estriol.

A sililação da testosterona foi feita durante 1 hora, a 60 °C, e a dos restantes esteróides, durante 12 horas, a 40 °C.

Os extractos contendo os esteróides não hidroxilados (progesterona e Δ^4-androstenediona) foram retomados com 100 µl de hexano e injectados sem qualquer derivatização.

Antes da reacção de sililação foram adicionados a todos os tubos 10 µg de padrão interno, epicoprostanol (5β-colestano-3α-ol), em solução etanólica. Foram preparados padrões de referência correspondentes a cada esteróide procurado, partindo-se de soluções etanólicas dos padrões e medindo-se uma alíquota corresponde a 10 µg.

A cromatografia foi feita num cromatógrafo GIRDEL com detector de ionização de chama, equipado com uma coluna capilar de vidro de 25 m de comprimento e 0,3 mm de diâmetro interno, e cheia com a fase estacionária SE52, sendo o gás transportador o hélio.

A coluna foi programada para uma temperatura inicial de 200 °C e uma temperatura final de 270 °C, com uma subida de 1,5 °C/min.

Os esteróides foram identificados pelo seu tempo de retenção relativo (TRR), em relação aos padrões de referência.

9 - ESPECTROMETRIA DE MASSA

As diferentes técnicas até aqui enumeradas permitiram o isolamento de certos compostos segundo as suas propriedades químicas. Coube à espectrometria de massa dar uma informação precisa quanto à massa desses compostos e também quanto à sua estrutura.

Esta análise foi precedida de uma separação em GLC, já descrita em 8.

O cromatógrafo encontrava-se ligado a um espectrómetro de massa RIBBER 1000 e a "balayage" periódica foi feita entre as massas de 50 e 450, dependendo das massas dos iões procurados. Sobre cada massa foi efectuada uma "balayage" com a duração de 2 ms e com a energia de 70 eV.

Os volumes injectados em GLC variaram entre 2 e 5 µl, quer para os padrões quer para as amostras, sendo os compostos identificados pelos TRR nos cromatogramas. Os espectros foram analisados no decurso da subida, no cimo e na descida do pico observado em cromatografia, a fim de eliminar as eventuais impurezas que apresentassem o mesmo TRR. Para uma perfeita identificação foram escolhidos pelo menos 4 iões característicos, para cada espectro de referência, de maneira a comparar os fragmentogramas com os dos compostos em estudo.

10 - RADIOIMUNOENSAIO (RIA)

Foi usado o conjunto de reagentes da bioMerieux para o doseamento dos cinco esteróides escolhidos: progesterona, Δ^4-androstenediona, testosterona, 17β-estradiol e estrona.

O princípio deste doseamento, igual para os cinco esteróides, baseou-se em dois pontos:

- realizar uma reacção de inibição competitiva entre o esteróide marcado com tritium (^{3}H-E), em quantidade constante, e o esteróide frio dos padrões e das amostras a dosear, em relação aos locais de ligação do anticorpo antiesteróide (anti-E), em quantidade constante.

$$\underbrace{{}^3\text{H-E} + \text{E}}_{\text{(F)}} + \text{(anti-E)} \rightleftharpoons \underbrace{\text{(anti-E)} - {}^3\text{H-E} + \text{(anti-E)} - \text{E}}_{\text{(B)}}$$

No fim da incubação, no momento do equilíbrio, a proporção de ^{3}H-E ligada é inversamente proporcional à quantidade de E dos padrões e das amostras (^{3}H-E e E não marcado supôs-se comportarem-se de maneira idêntica).

- separar por centrifugação a radioactividade do esteróide ligado (B) ao anticorpo, da do esteróide livre (F), previamente adsorvido pelo carvão recoberto de dextran, e contar a radioactividade do ^{3}H-esteróide ligado.

A concentração de cada um dos esteróides na amostra foi calculada comparando a sua actividade à de uma **curva padrão de resposta**, preparada a partir de padrões do esteróide (concentrações compreendidas entre 6,25 e 400 pg por tubo), pelo mesmo método.

Para todos os ensaios foi medido o **coeficiente de rendimento** de purificação, o que permitiu controlar a qualidade da extracção e, quando no método foi introduzida a cromatografia em coluna, a qualidade da separação cromatográfica (chromatolithe A).

No radioimunoensaio foram utilizadas alíquotas da suspensão aquosa obtida após deslipidificação. Estas fracções aquosas foram evaporadas à secura e o resíduo dissolvido em 10 ml de etanol. Desta solução foram medidos os seguintes volumes (usados com base em anteriores doseamentos de esteróides, com o mesmo conjunto de reagentes, levados a cabo nas gónadas de um molusco gastrópode, *Helix aspersa*): 0,1 ml para o doseamento da progesterona; 0,5 ml para o da Δ^4-androstenediona; 1 ml para o da testosterona; 0,5 ml para o do 17β-estradiol e 2 ml para o da estrona.

A sequência da técnica, que se passa a descrever, foi idêntica para qualquer dos cinco esteróides em estudo:

Uma pequena quantidade de ^{3}H-E "rendimento" foi adicionada aos extractos etanólicos, seguida da extracção pelo éter (5 a 7 ml), feita em tubos fechados e agitados durante 2 min; após um repouso durante alguns minutos para decantação, as fases aquosas foram congeladas por imersão em neve carbónica, e as fases etéreas passadas para novos tubos de vidro e evaporadas a 30 °C em atmosfera de azoto. Os extractos foram retomados com 1 ml de isoctano e em seguida cromatografados sobre chromatolithe A - doseamento da Δ^4-androstenediona, testosterona e estrona, tendo-se usado na eluição da primeira o isoctano, e na das outras duas uma mistura de isoctano-acetato de etilo, na proporção de 80:20 (v/v). As fracções eluídas foram evaporadas a 50 °C em atmosfera de azoto e os extractos dissolvidos com tampão (PBS-BSA), agitados energicamente, deixados 30 min à temperatura ambiente, e de novo agitados.

A ordem de adição e os volumes dos reagentes adicionados a cada

tubo estão representados no quadro 1.

QUADRO 1 - Protocolo do radioimunoensaio

TUBOS	ORDEM DA ADIÇÃO E VOLUME DOS REAGENTES ADICIONADOS A CADA TUBO			
	Tampão (PBS-BSA) (ml)	Soluções padrão do esteróide (ml)	Soro antiesteróide (ml)	^{3}H esteróide -doseamento (ml)
Actividade total (T)	0,7			0,1
Actividade não específica (N)	0,2			0,1
Padrões				
0 pg	0,1		0,1	0,1
6 - 500 pg		0,1	0,1	0,1
		Soluções dos extractos secos (ml)		
Branco		0,1	0,1	0,1
Amostras a dosear		0,1	0,1	0,1

Feitas as medições os tubos foram agitados e incubados (1h 30min no mínimo), em banho de água com gelo, assim como a suspensão de carvão-dextran. Seguiu-se a adição de 0,5 ml da suspensão de carvão--dextran e nova incubação durante 10 min, à mesma temperatura. Passado este tempo todos os tubos, à excepção do tubo T, foram centrifugados durante 10 min em centrífuga refrigerada, e dos sobrenadantes pipetaram-se 0,5 ml (também do tubo T) para frascos de contagem com 5 ml de picoflúor 30. Os frascos, depois de bem rolhados, foram agitados e contada a radioactividade num analisador de cintilação líquida (regulado para tritium), durante 2 minutos.

RESULTADOS

No quadro 2 estão representados alguns dos parâmetros físicos e químicos medidos nas amostras de *Mytilus*.

QUADRO 2 - Comprimento médio (±DP), pesos fresco e seco, quantidade de lípidos totais e quantidade relativa de água referentes aos animais das amostras I e II

		Nº de animais	COMPRIMENTO MÉDIO (cm)	PESO FRESCO TOTAL (g)	PESO FRESCO MÉDIO (g)	PESO SECO TOTAL (g)	PESO SECO MÉDIO (g)	ÁGUA (%)	LIPIDOS TOTAIS (g)
Amostra I (14.12.82)	♂	16	5,92 ± 0,46	99,08	6,19	11,90	0,744	88,0	1,47
	♀	13	6,01 ± 0,40	79,31	6,10	12,10	0,931	84,7	2,00
Amostra II (12.02.83)	♂	20	5,56 ± 0,25	107,35	5,37	18,04	0,902	83,2	2,17
	♀	18	5,56 ± 0,20	74,45	4,14	13,69	0,760	81,6	1,99

O peso fresco médio foi, nas duas amostras, ligeiramente superior nos machos, o mesmo acontecendo em relação à percentagem de água medida no animal inteiro.

No que respeita ao peso seco médio (obtido por liofilização dos tecidos), os teores encontrados parecem variar no mesmo sentido dos valores medidos para os lípidos totais.

Depois da deslipidificação e da separação por cromatografia em coluna e camada fina, os extractos finais foram injectados no sistema cromatógrafo gás-líquido - espectrómetro de massa; os espectrogramas, obtidos com os esteróides das amostras, foram comparados com os espectrogramas dos esteróides usados como referência, em função da m/e dos fragmentos dos iões maiores, relação de áreas dos picos, selecção de iões e tempos de retenção relativos (páginas 18 a 25).

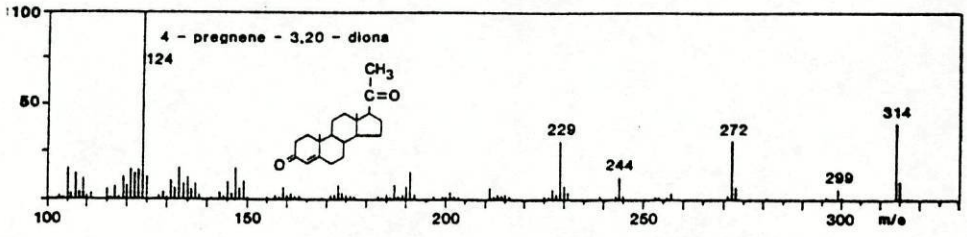


FIG. 4 - Espectro de referência da progesterona

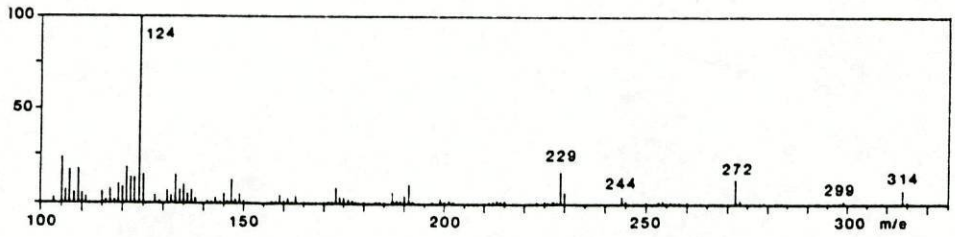


FIG. 5 - Espectro de massa da progesterona isolada de *Mytilus* macho

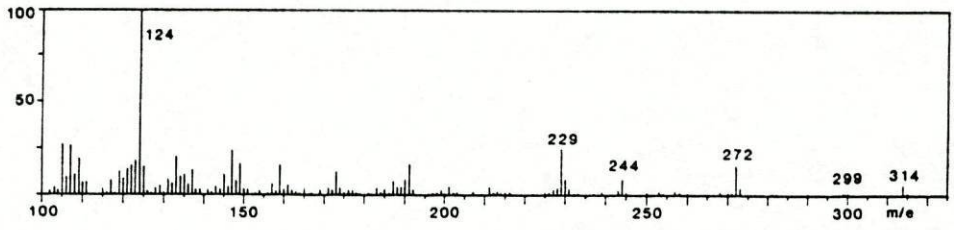


FIG. 6 - Espectro de massa da progesterona isolada de *Mytilus* fêmea

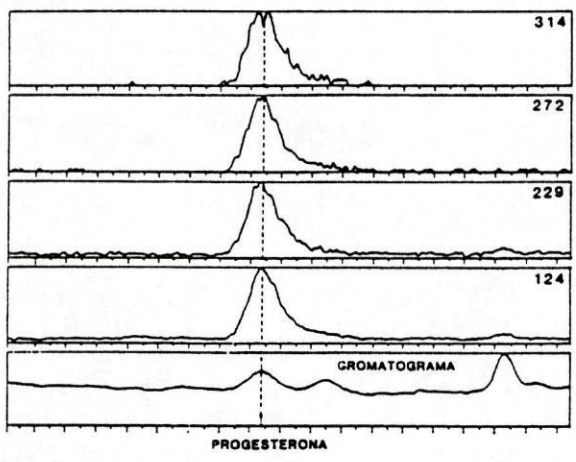


FIG. 7 - Fragmentograma da progesterona isolada de *Mytilus* macho

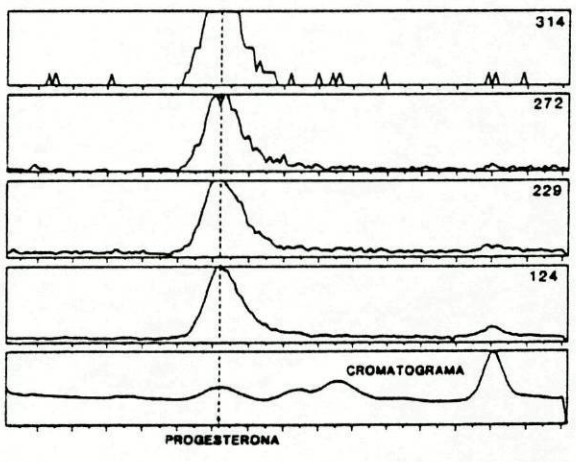


FIG. 8 - Fragmentograma da progesterona isolada de *Mytilus* fêmea

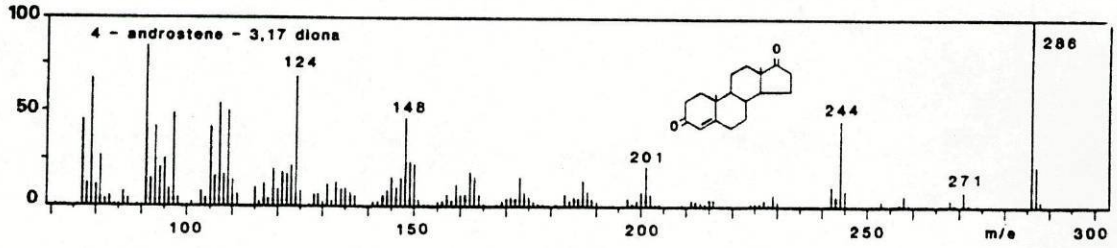


FIG. 9 - Espectro de referência da Δ^4-androstenediona

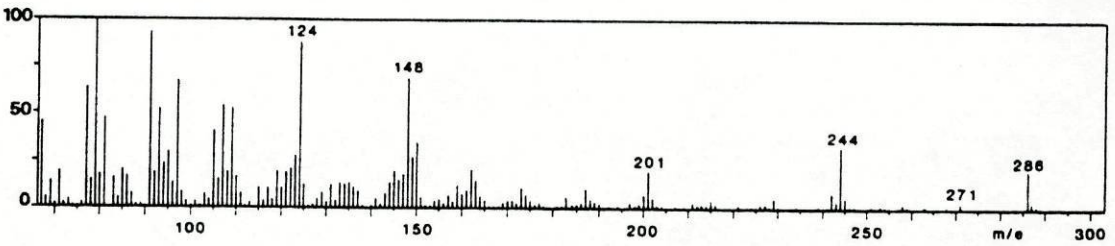


FIG. 10 - Espectro de massa da Δ^4-androstenediona isolada de *Mytilus* macho

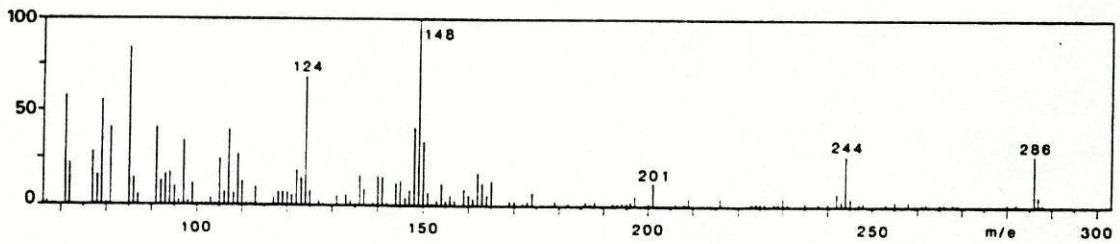


FIG. 11 - Espectro de massa da Δ^4-androstenediona isolada de *Mytilus* fêmea

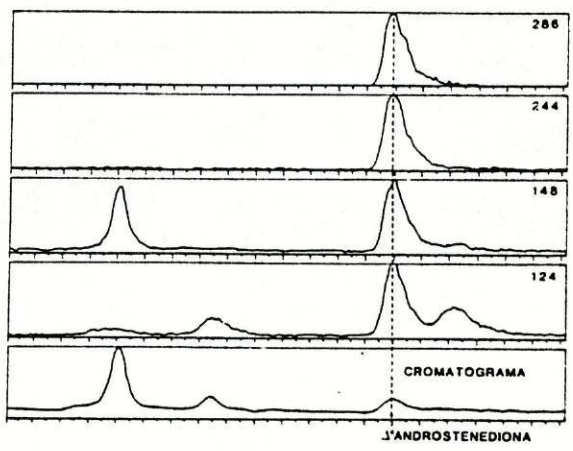


FIG. 12 - Fragmentograma da Δ^4-androstenediona isolada de *Mytilus* macho

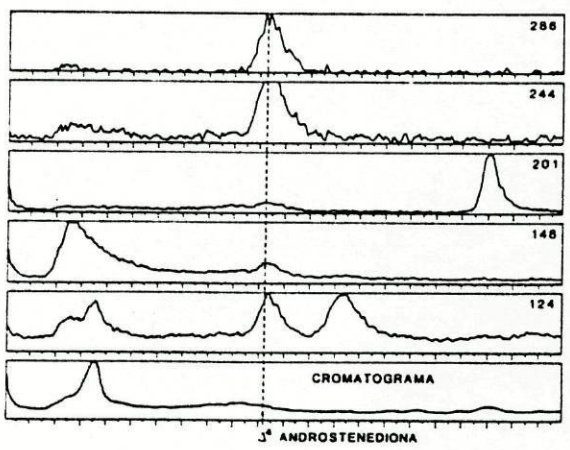


FIG. 13 - Fragmentograma da Δ^4-androstenediona isolada de *Mytilus* fêmea

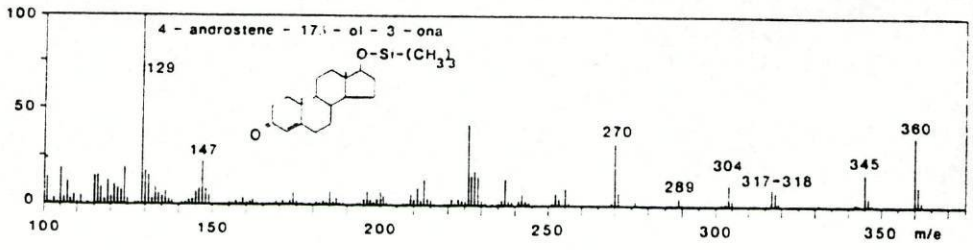


FIG. 14 - Espectro de referência do derivado TMS da testosterona

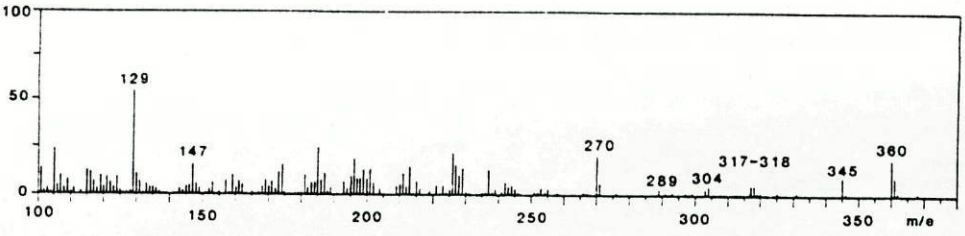


FIG. 15 - Espectro de massa do derivado TMS da testosterona isolada de *Mytilus* macho

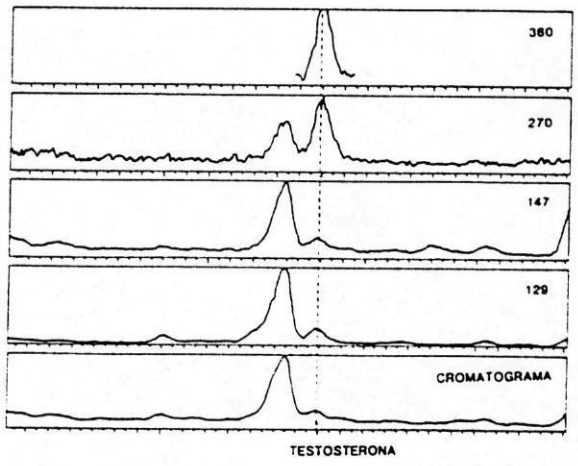


FIG. 16 - Fragmentograma do derivado TMS da testosterona isolada de *Mytilus* macho

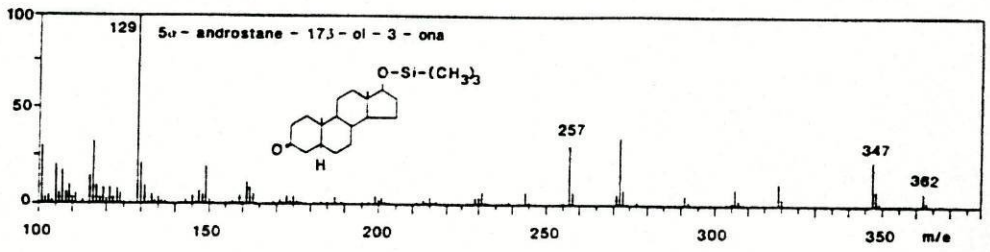


FIG. 17 - Espectro de referência do derivado TMS da 5α--diidrotestosterona

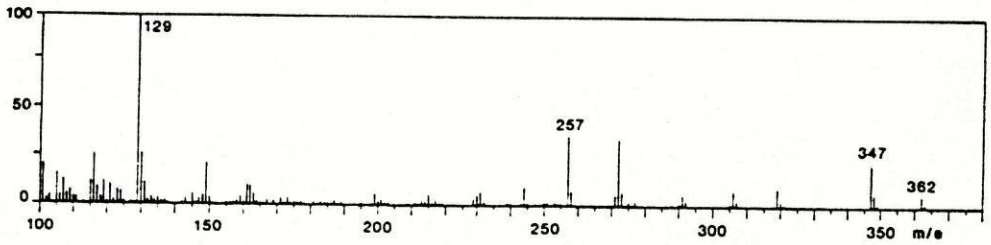


FIG. 18 - Espectro de massa do derivado TMS da 5α-diidrotestosterona isolada de *Mytilus* macho

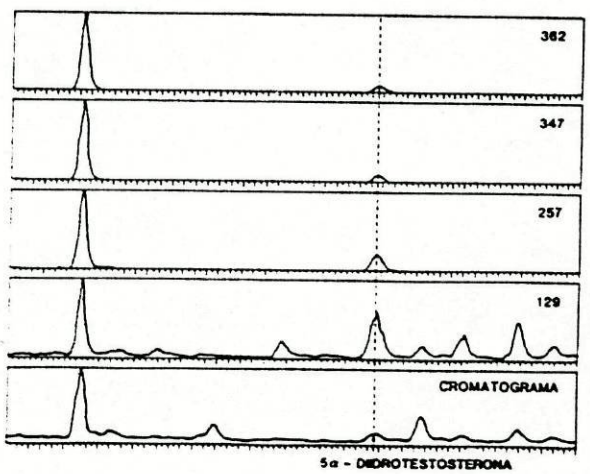


FIG. 19 - Fragmentograma do derivado TMS da 5α-diidrotestosterona isolada de *Mytilus* macho

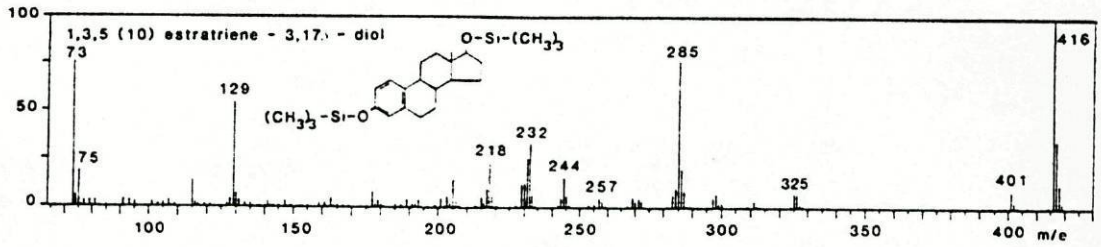


FIG. 20 - Espectro de referência do derivado TMS do 17β-estradiol

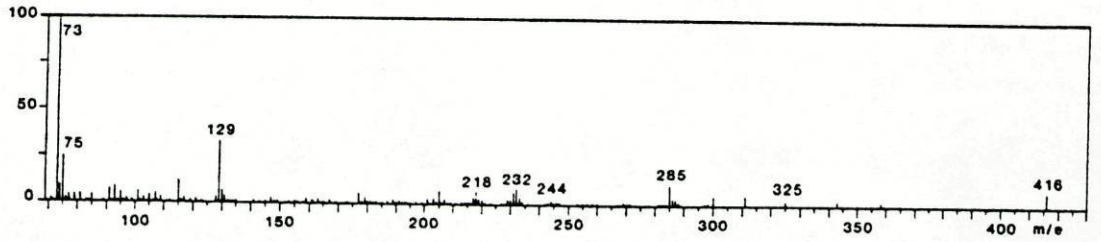


FIG. 21 - Espectro de massa do derivado TMS do 17β-estradiol isolado de *Mytilus* macho

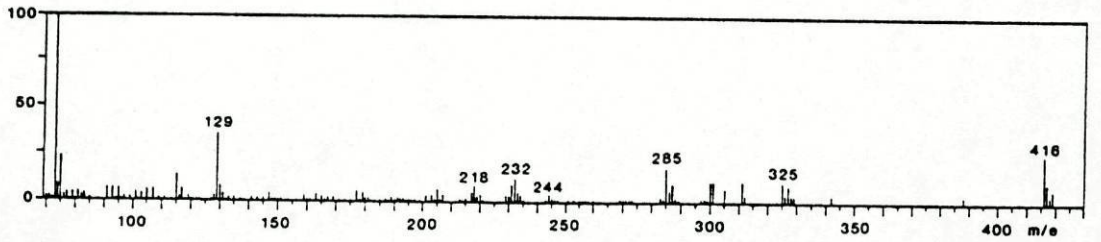


FIG. 22 - Espectro de massa do derivado TMS do 17β-estradiol isolado de *Mytilus* fêmea

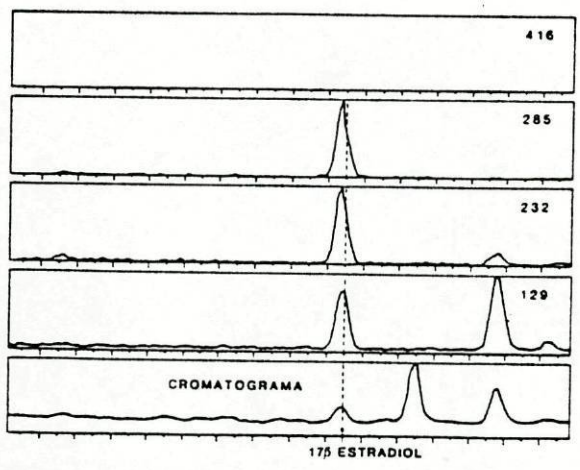


FIG. 23 - Fragmentograma do derivado TMS do 17β-estradiol isolado de *Mytilus* macho

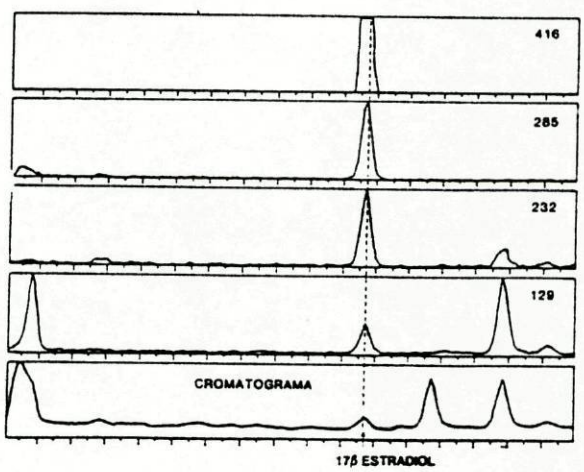


FIG. 24 - Fragmentograma do derivado TMS do 17β-estradiol isolado de *Mytilus* fêmea

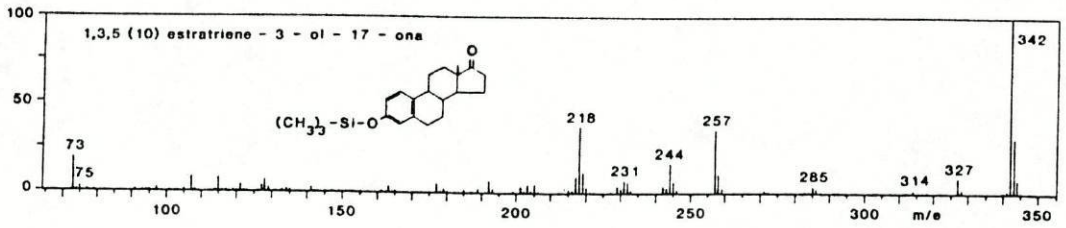


FIG. 25 - Espectro de referência do derivado TMS da estrona

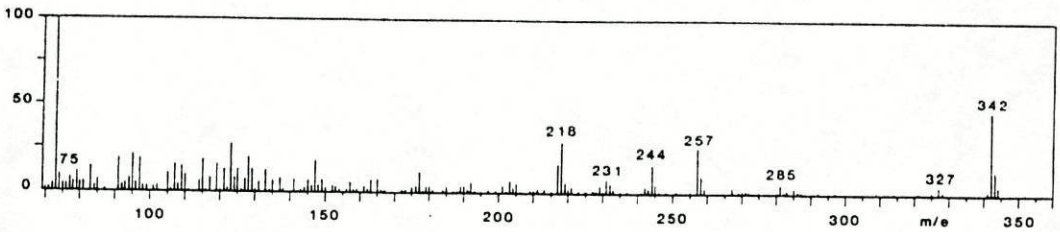


FIG. 26 - Espectro de massa do derivado TMS da estrona isolada de *Mytilus* fêmea

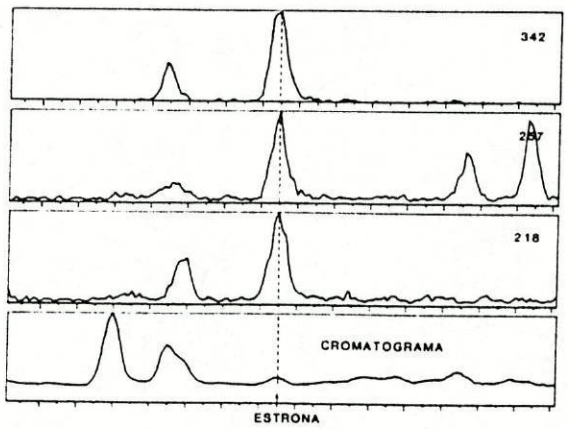


FIG. 27 - Fragmentograma do derivado TMS da estrona isolada de *Mytilus* fêmea

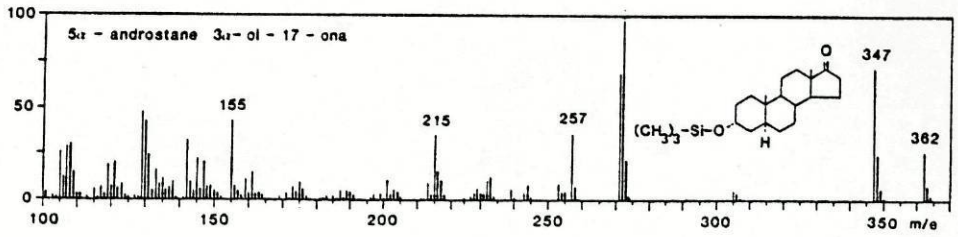


FIG. 28 - Espectro de referência do derivado TMS da androsterona

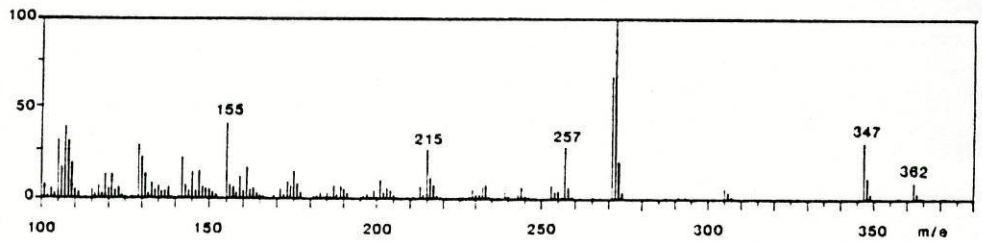


FIG. 29 - Espectro de massa do derivado TMS da androsterona isolada de *Mytilus* macho

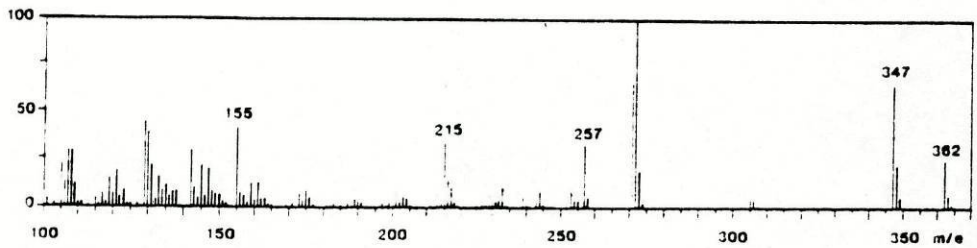


FIG. 30 - Espectro de massa do derivado TMS da androsterona isolada de *Mytilus* fêmea

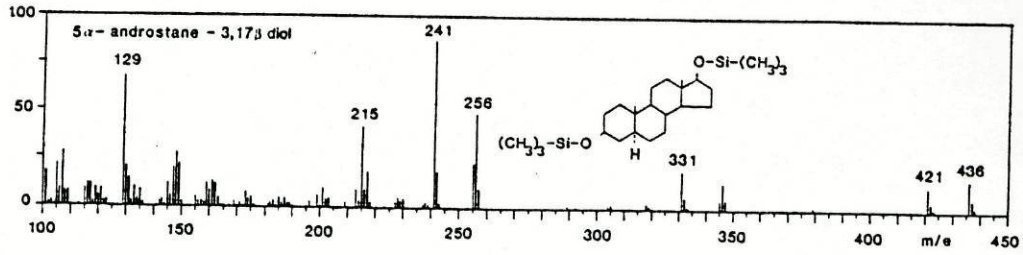


FIG. 31 - Espectro de referência do derivado TMS do androstanediol

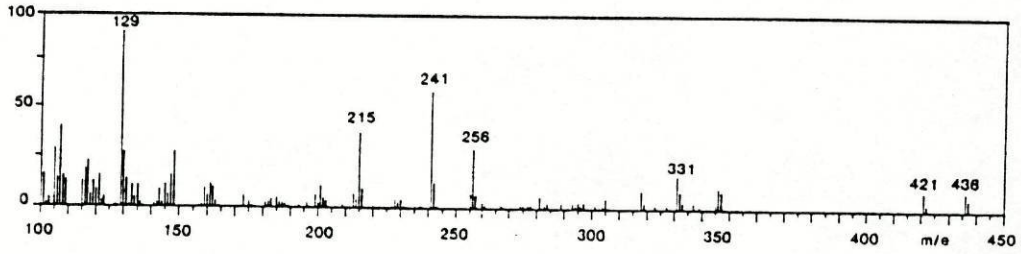


FIG. 32 - Espectro de massa do derivado TMS do androstanediol isolado de *Mytilus* macho

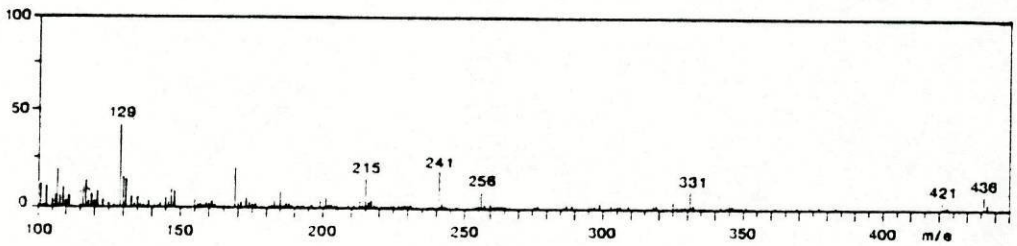


FIG. 33 - Espectro de massa do derivado TMS do androstanediol isolado de *Mytilus* fêmea

O estriol não foi detectado nas duas amostras e a diidrotestosterona só foi detectada, em fraca quantidade, nos machos da amostra I. Na mesma amostra, e quer para os machos quer para as fêmeas, foram encontradas a desidroepiandrosterona e a androsterona, esta última em maior quantidade. Na amostra II foi detectada a androsterona e o androstanediol, tanto nos machos como nas fêmeas, em quantidades semelhantes.

Se bem que esta técnica fosse eminentemente qualitativa, permitiu no entanto dar uma indicação da quantidade relativa de cada esteróide na amostra analisada, como mostra o quadro 3.

QUADRO 3 - Quantidades relativas em esteróides obtidas por Cromatografia Gás-Líquido - Espectrometria de Massa

	Amostra I		Amostra II	
	♂	♀	♂	♀
Progesterona	++++	+++	+	+
Androstenediona	+++	+++	+	++
Testosterona	ND	ND	++	ND
Estradiol	NI	+	+	+
Estrona	NI	+	ND	+

A grandeza dos valores é representada de + a ++++

ND - não detectado
NI - não injectado

No quadro 4 estão descritas as quantidades dos esteróides referidos a peso fresco, peso seco e lípidos totais, obtidos no radioimunoensaio.

Como se pode observar a progesterona foi o esteróide doseado em maior quantidade. A quantidade deste esteróide, referida a lípidos totais, encontrada nos machos da amostra I, foi praticamente o dobro da doseada para as fêmeas. Já na amostra II os valores apresentados foram

QUADRO 4 - Níveis de progesterona, androstenediona, testosterona, estradiol e estrona obtidos no radioimunoensaio

		ng/g peso fresco		ng/g peso seco		ng/g lípidos totais	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
Progesterona	Amostra I	5,07	4,75	42,22	31,14	341,77	188,40
	Amostra II	0,29	0,63	1,74	3,44	14,47	23,67
Androstenediona	Amostra I	3,23	3,68	26,69	24,10	217,69	145,80
	Amostra II	0,86	1,13	5,10	6,17	42,40	42,46
Testosterona	Amostra I	0,16	0,20	1,31	1,33	10,59	8,06
	Amostra II	0,72	0,51	4,31	2,75	35,85	18,94
Estradiol	Amostra I	0,021	0,023	0,174	0,157	1,41	0,95
	Amostra II	0,038	0,053	0,226	0,288	1,88	1,97
Estrona	Amostra I	0,048	0,045	0,403	0,294	3,26	1,78
	Amostra II	0,055	0,080	0,330	0,437	2,74	3,01

20 vezes menores nos machos e cerca de 10 vezes menores nas fêmeas quando relacionados com os da amostra I. Se compararmos estes valores com as quantidades relativas indicadas pelo método GLC-EM (quadro 3), esta ordem de grandeza não é alterada.

Para a Δ^4-androstenediona os valores doseados nos machos da amostra I são também superiores aos das fêmeas, sendo os encontrados na GLC-EM um sinal indicativo de que este esteróide estava em quantidade facilmente detectável. Na amostra II os valores são menores, quer para os machos quer para as fêmeas, mas muito idênticos entre si; na GLC-EM pôde-se observar a indicação da sua existência em fraca quantidade.

Passando agora a referir a testosterona, qualquer que seja o parâmetro a que for referida, a quantidade deste esteróide é sempre superior nos machos, no que respeita à amostra II; pela análise em GLC-EM só foi possível obter o espectrograma da testosterona para os machos da amostra II. Estes resultados discordantes poder-se-iam justificar pela

existência de interferências no radioimunoensaio, devido à existência de reacções cruzadas descritas abaixo.

Quanto ao 17β-estradiol, os resultados obtidos mostram quantidades muito próximas, quer para os machos quer para as fêmeas, das duas amostras. A pequena discrepância entre os valores dos machos e das fêmeas da amostra I nota-se unicamente quando são referidos a lípidos totais; a análise em GLC-EM deu a indicação de quantidades pequenas, mas ainda detectáveis.

Os valores de estrona encontrados são também muito baixos e próximos entre si, o que está de acordo com o GLC-EM, com excepção para os machos da amostra II, em que não foi detectada, talvez por apresentar um tempo de retenção muito próximo de qualquer impureza existente e em quantidade superior.

Convém referir por fim as reacções cruzadas descritas para o radioimunoensaio entre cada esteróide e o soro antiesteróide respectivo:

100% progesterona - 6% desoxicorticosterona
39% 5α-diidroprogesterona

100% Δ^4-androstenediona - 11,6% androsterona
2,7% adrenosterona

100% testosterona - 45% 5α-diidrotestosterona
22% 5β-diidrotestosterona

100% 17β-estradiol - 7,0% 6-oxo-17β-estradiol
3,3% estrona

100% estrona - 2,90% estradiol
0,04% estriol

DISCUSSÃO

Estudos bastante complexos sobre a metabolização dos esteróides em invertebrados, feitos na década de setenta, usando precursores marcados com tritium (^{3}H) e carbono (^{14}C), vieram confirmar a existência nestes animais de algumas das enzimas intervenientes na biossíntese das hormonas esteróides.

Fazendo uma revisão do trabalho desenvolvido até ao presente foi possível constatar que os moluscos, e dentro destes a classe dos gastrópodes pulmonados terrestres, estavam em primeiro lugar no conhecimento endócrino, tanto na biossíntese como no mecanismo de regulação hormonal.

Gottfried e Dorfman (1970) demonstraram um metabolismo activo da androstenediona pela fracção mitocondrial-microssomal do género *Ariolimax*, obtendo como produtos finais o 3α-androstanediol e o 3β-androstanediol, na presença e na ausência do tentáculo óptico. Os mesmos autores, com a utilização de precursores marcados, estabeleceram a seguinte sequência metabólica para a fase masculina da glândula hermafrodita deste gastrópode:

colesterol → pregnenolona → 17α-hidroxipregnenolona →
→ desidroepiandrosterona → androstenediona

Ainda dentro da mesma classe, e em *Crepidula fornicata*, Bardon et al. (1971) puseram em evidência, nas gónadas e no hepatopâncreas deste animal, a presença da $C_{17,20}$-liase, da 3β-hidroxiesteróide desidrogenase (3β-HSD), da $\Delta^{5,4}$-isomerase e da 17β-hidroxiesteróide desidrogenase (17β-HSD), enzimas activas na biossíntese de esteróides.

Estes autores, sem demonstrarem a presença de androgénios e estrogénios nesta espécie, formularam a hipótese de certas substâncias, emitidas pelas gónadas, serem as responsáveis pela diferenciação do tracto genital, e ainda que as neurohormonas secretadas pelos gânglios cerebróides desempenhariam um papel importante na diferenciação das

gónadas, como já tinha sido anteriormente referido (Streiff, 1967; Le Breton, 1969; Lubet e Streiff, 1969).

A procura de esteróides foi iniciada bastante antes por uma tentativa feita por Steidl (1930) para demonstrar uma actividade estrogénica na *Aplysia* (gastrópode). Mais tarde, Gottfried e Losis (1966) identificaram por cromatografia gasosa a 11-cetotestosterona, a testosterona e a 17α-hidroxiprogesterona, a partir dos ovos de *Arion ater*, um outro gastrópode.

Se para esta classe os resultados se mostravam concordantes, o mesmo já não acontecia na classe dos lamelibrânquios, em que eram por vezes contraditórios.

Num estudo para tentar demonstrar a biossíntese de esteróides nos lamelibrânquios, De Longcamp et al. (1970) descreveram a existência da 17β-HSD nas gónadas de *Mytilus edulis*, responsável pela transformação da androstenediona em testosterona e vice-versa. Constataram ainda a ausência da $C_{17,20}$-liase pela não transformação da 17α-hidroxiprogesterona em androstenediona.

Em 1974 os mesmos autores, trabalhando com as gónadas masculina e feminina de *Mytilus*, e usando precursores radioactivos, demonstraram a existência de quatro sistemas enzimáticos: o complexo 3β-HSD - - $\Delta^{5,4}$-isomerase (pregnenolona → progesterona, desidroepiandrosterona → androstenediona); a $C_{17,20}$-liase (17α-hidroxiprogesterona → → androstenediona); a 17β-HSD (desidroepiandrosterona → androstanediol, androstenediona ⇄ testosterona, estradiol ⇄ estrona) e uma 5α-reductase (testosterona → 5α-diidrotestosterona).

Um outro aspecto neste campo foi a comparação da composição de esteróides entre os gastrópodes e os lamelibrânquios, usando a cromatografia gás-líquido. Theshima e Kanazawa (1972) verificaram que nos gastrópodes, além de outros esteróides em C_{27} e C_{28} (42 - 64%), o colesterol era o esteróide que se encontrava em maior quantidade. Nos lamelibrânquios a percentagem era inferior (26 - 35%), revelando ainda uma composição em esteróides muito complexa.

Passando para o estudo da bioconversão, estes mesmos autores, em 1973, injectaram 26-^{14}C-desmosterol em *Mytilus edulis* e verificaram que

este possuia a capacidade de converter aquele composto em colesterol, 22-diidrocolesterol e 24-metilenocolesterol, o que lhes permitia afirmar que este lamelibrânquio possuia a capacidade de sintetizar esteróides a partir de precursores, e que também o desmosterol, tal como acontecia nos vertebrados, era um intermediário na síntese do colesterol.

Para Walton e Pennock (1972) faltava ao *Mytilus* a capacidade de utilizar a 2-^{14}C-mevalonato como precursor na síntese de esteróides, mas Theshima e Kanazawa (1973) demonstraram que esta afirmação não era correcta, pois este animal tinha a capacidade de incorporar este composto na fracção esteróide.

Voogt (1975), ao estudar a possibilidade de síntese dos 3β-esteróides em moluscos, demonstrou em alguns lamelibrânquios, como por exemplo a *Anodonta cygnea*, que após a injecção do 1-^{14}C-acetato este era incorporado na fracção esteróide em C_{27}, e ainda a alquilação a C_{28} e C_{29}.

Mas para além destes dados bioquímicos, também a presença de estruturas relacionadas com a síntese dos esteróides mereceu alguma atenção; neste sentido, Schoemmacker et al. (1977) descreveram, não só a presença nos ovários da estrela-do-mar, *Asterias rubens*, da classe dos equinodermes, de células com as características das células produtoras de esteróides, mas ainda que a actividade dessas células estava relacionada com a actividade da enzima 3β-HSD. Os mesmos autores, e ainda no mesmo animal, puseram em evidência a presença de uma 17α-hidroxilase, C_{17-20}-liase, 17β-HSD, 20β-HSD, 21α-hidroxilase e 5α-reductase, por incubação dos ovários e ceco pilórico com progesterona.

Todos estes trabalhos estabeleceram de uma maneira incontroversa a presença, quer das enzimas intervenientes na síntese e biotransformação dos esteróides, quer mesmo da presença de esteróides endógenos em alguns invertebrados.

O nosso trabalho teve como objectivo integrar-se na sequência dos resultados descritos. Pretendemos assim demonstrar a existência de esteróides endógenos no lamelibrânquio *Mytilus*, que nos vertebrados têm

funções muito específicas na reprodução, como os progestagénios, os androgénios e os estrogénios.

Utilizando técnicas que nos permitiram uma boa purificação do extracto biológico, como a cromatografia em coluna e em camada fina, bem como técnicas de grande precisão analítica, como a cromatografia gás-líquido - espectrometria de massa, pudemos identificar os esteróides procurados, mesmo quando se encontravam em quantidades muito pequenas.

A presença da progesterona em quantidade que nos vertebrados é já considerada de interesse fisiológico (ng/g), e da androstenediona, um metabolito activo obtido a partir da progesterona, deram significado à presença de enzimas que anteriormente tinham sido postas em evidência.

A identificação da testosterona veio confirmar a hipótese, posta por Lubet, da existência deste esteróide na gónada masculina de *Mytilus*.

No que respeita ao 17β-estradiol e à estrona, se bem que por experiências *in vivo* tenha sido obtida a sua interconversão (estradiol $\rightleftarrows$ estrona), a confirmação como esteróides endógenos não tinha ainda sido feita, possivelmente porque as técnicas utilizadas não eram suficientemente sensíveis, ou então porque os animais foram estudados em épocas que não correspondiam ao máximo do teor em esteróides.

Mais uma confirmação para estes resultados foi a caracterização de metabolitos destes esteróides, como a androsterona e o 5α-androstanediol, a partir da androstenediona e da diidrotestosterona.

No final desta fase do nosso trabalho é possível afirmar a existência destes esteróides em *Mytilus*, porque:

1º - A separação efectuada por cromatografia troca iónica, permitiu uma separação eficaz entre esteróides neutros e estrogénios;

2º - Por cromatografia em camada fina estes esteróides apresentaram os mesmos R_f dos esteróides usados como referência;

3º - Por cromatografia gás-líquido estes esteróides apresentaram tempos de retenção idênticos aos dos esteróides de referência;

4º - Por espectrometria de massa estes esteróides deram origem a um espectro idêntico ao dos esteróides de referência.

Mas para além da confirmação da existência dos esteróides endógenos, os valores encontrados permitem-nos avançar a hipótese da sua variação ao longo do ano, e mesmo uma relação com a fase do ciclo reprodutivo. A identificação de androgénios e estrogénios em *Mytilus* poderá não implicar, necessariamente, a acção destes esteróides como hormonas sexuais, e, mesmo desempenhando um papel na reprodução, não pretendemos concluir de imediato que ele seja idêntico ao desempenhado nos mamíferos.

BIBLIOGRAFIA

ADESSI, G.L., EICHENBERGER, D., NHUAN, T.Q. and JAYLE, M.F. (1975). Gas chromatography profile of estrogens: application to pregnancy urine. *Steroids* **25**: 553-564.

ADLERCREUTZ, H., MARTIN, F. and LINDSTRÖM, B. (1978). Gas chromatographic and mass spectrometric studies on oestrogens in bile: Part II. Men and non-pregnant womem. *J. Steroid Biochem.* **9**: 1197-1205.

ADLERCREUTZ, H. and JÄRVENPÄÄ, P. (1982). Assay of estrogens in human feces. *J. Steroid. Biochem.* **17**: 639-645.

AUBRY, R. (1962). Étude de l'hermaphrodisme et l'action pharmacodynamique des hormones de vertébrés chez les Gastéropodes Pulmonés. Thèse Fac. Sc. Univ. Strabourg. Manon, Paris.

AUSTIN, J. (1970). The sterols of marine invertebrates and plants. In *Advances in steroid biochemistry* (Ed. by M.H. Briggs), Vol. I, pp. 73-96. Academic Press. New York.

BARDON, O., LUBET, P. and DROSDOWSKY, M.A. (1971). Biosynthèse des stéroïdes chez un mollusque gastéropode marin, *Crepidula fornicata* (Phil.). *Steroidologia* **2**: 366-377.

BLIGH, E.G. and DYER, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 1911--1917.

BROERTJES, J.J.S., DE WAARD, P. and VOOGT, P.A. (1984). Purification and characterization of vitellogenic substances in the starfish *Asterias rubens* (L.). *Mar. Biol. Lett.* **5**: 99-104.

CARREAU, S. and DROSDOWSKY, M. (1977). The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.). *Gen. Comp. Endocr.* **33**: 554-565.

DE CLERCK, D., EECHAUTE, W., LEUSEN, I., DIEDERIK, H. and DE LOOF, A. (1983). Identification of testosterone and progesterone in hemolymph of larvea of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. *Gen. Comp. Endocr.* **52**: 368-378.

DE CLERCK, D., DIEDERIK, H. and DE LOOF, A. (1984). Identification by capillary gas chromatography-mass spectrometry of eleven non--ecdysteroid in the haemolymph of larvae of *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem.* **14**: 199-208.

DE LONGCAMP, D., DROSDOWSKY, M. and LUBET, P. (1970). Biosynthèse des stéroïdes chez les mollusques. Mise en évidence d'une 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase dans les gonades de *Mytilus edulis* L. (mollusque bivalve). *C. R. Acad. Sc. Paris* **271**: 1564--1566.

DE LONGCAMP, D., LUBET, P. and DROSDOWSKY, M. (1974). The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *Gen. Comp. Endocr.* **22**: 116-127.

DI PRISCO, C.L., FULGHERI, F.D. and TOMASUCCI, M. (1973). Identification and biosynthesis of steroids in the marine mollusc *Aplysia depilans*. *Comp. Biochem. Physiol.* **45**: 303-310.

DI PRISCO, C.L. and FULGHERI, F.D. (1975). Alternative pathways of steroid biosynthesis in gonads and hepatopancreas of *Aplysia depilans*. *Comp. Biochem. Physiol.* **50B**: 191-195.

EBERLEIN, W.R. (1969). The measurement of low levels of estrone and estradiol-17β in urine, employng ion-exchange, thin-layer, and gas-liquid chromatography. *Steroids* **14**: 553-573.

GERAERTS, W.P.M. (1976). The control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocr.* **29**: 61-71.

GERAERTS, W.P.M. and ALGERA, L.H. (1972). On the influence of the dorsal bodies and the adjacent neurosecretory cells on the differentiation of the reprodutive tract in *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocr.* **18**: 66.

GERAERTS, W.P.M. and ALGERA, L.H. (1976). The stimulating effect of the dorsal body hormone on cell differentiation in the female acessory sex organs of the hermaphrodite freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocr.* **29**: 109-118.

GOMOT, L. (1976). Ultrastructural changes in the multiple glandes of the snail *Helix aspersa* following castration. Abstract. VIIIth Conference of European Comparative Endocrinologists. Bangor. *Gen. Comp. Endocr.* **29**.

GOTTFRIED, H. and LUSIS, O. (1966). Steroids of invertebrates: The *in vitro* production of 11-ketotestosterone and other steroids by the eggs of the slug *Arion ater rufus* L. *Nature (London)* **212**: 1488--1489.

GOTTFRIED, H. and DORFMAN, R.I. (1970). V. The *in vitro* biosynthesis of steroids by the male-phase ovotestis of the slug (*Ariolimax californicus*). *Gen. Comp. Endocr.* **15**: 120-138.

GOTTFRIED, H. and DORFMAN, R.I. (1970). VI. Effect of tentacular homogenates *in vitro* upon post-androstenedione metabolism in the male fase of *Ariolimax californicus* ovotestis. *Gen. Comp. Endocr.* **15**: 139-142.

GUYARD, A. (1971). Étude de la différentiation de l'ovotestis et des facteurs controllant l'orientation sexuelle des gonocytes de l'escargot *Helix aspersa* Müller. Thèse de Sciences. Besançon.

IDLER, D.R. and WISEMAN, P. (1972). Molluscan sterols: a review. *J. Fish. Res. Bd. Canada* **29**: 385-398.

IDLER, D.R., KHAHL, M.W., BROOKS, C.J.W., EDMONDS, C.G. and GILBERT, J.D. (1978). Studies of sterols from marine molluscs by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* **59B**: 163-167.

JÄRVENPÄÄ, P., FOTSIS, T. and ADLERCREUTZ, H. (1979). Ion exchange purification of estrogens. *J. Steroid Biochem.* **11**: 1583-1588.

JOOSSE, J. (1978). Endocrinology of molluscs. *Actualités sur les hormones d'invertébrés* **251**: 107-123.

KARLSON, P. (1974). *Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophylly* (Ed. by Burdette, W.J.) pp. 43-54. Springer. New York.

KRZYNOWEK, J., WIGGIN, K. and DONAHUE, P. (1982). Sterol and fatty acid content in three groups of surf clams (*Spisula solidissima*): wild clams (60 and 120 mm size) and cultured clams (60 mm size). *Comp. Biochem. Physiol.* **74B**: 289-293.

LE BRETON, J. (1969). Analyse expèrimentale comparée des facteurs determinants du cycle du tractus génital male chez un Gastéropode hermaphrodite *Crepidula fornicata* (Phil) et chez un Gastéropode gonochorique *Littorina littorea* L. Thèse Doctorat en Biologie Animale. Caen.

LEHOUX, J.G. and SANDOR, T. (1969). Conversion of testosterone to Δ^4--androstene-3,17-dione by house cricket (*Gryllus domesticus*) male gonad preparations *in vitro*. *Endocrinology* **84**: 652-657.

LEHOUX, J.G. and SANDOR, T. (1970). The ocurrence of steroids and steroid metabolizing enzyme systems in invertebrates. *Steroids* **16**: 141-171.

LUBET, P. and STREIFF, W. (1969). Étude expérimentale de l'action des ganglions nerveux sur la morphogénèse du pénis et l'activité gènitale de *Crepidula fornicata* Phil. (Mollusque Gastéropode). Cours et Documents de Biologie 1: 141-159. Ed. Gordon et Breach. Paris.

MECHOULAM, R., BRUEGGEMEIER, R.W. and DENLINGER, D.L. (1984). Estrogens in insects. *Experientia* **40**: 942-944.

MORREAL, C.E., DAO, T.L. and LONERGAN, P.A. (1972). An improved method for the detection of estrone, estradiol, and estriol in low titer urine. *Steroids* **20**: 383-391.

POPOV, S., STOILOV, I., MAREKOV, N., KOVACHEV, G. and ANDREEV, St. (1981). Sterols and their biosynthesis in some freshwater bivalves. *Lipids* **16**: 663-669.

SALIOT, A. and BARBIER, M. (1971). Sur l'isolement de la progestèrone et de quelques cétotéroides de la partie femelle des gonades de la Coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*. *Biochimie* **53**: 265-266.

SANDOR, T. (1980). Steroids in invertebrates. In *Advances in Invertebrate Reproduction* pp. 81-95.

SCHOENMAKERS, H.J.N. (1979). *In vitro* biosynthesis of steroids from cholesterol by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.* **63B**: 179-184.

SCHOENMAKERS, H.J.N. (1980). The variation of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity of the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens* during the annual reproductive cycle. *J. Comp. Physiol.* **138**: 27-30.

SCHOENMAKERS, H.J.N., COLENBRANDER, P.H.J.M. and PEUTE, J. (1977). Ultrastructural evidence for the existence of steroid synthesizing cells in the ovary of the starfish, *Asterias rubens* (Echinodermata). *Cell Tiss. Res.* **182**: 275-279.

SCHOENMAKERS, H.J.N. and VOOGT, P.A. (1980). *In vitro* biosynthesis of steroids from progesterone by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Gen. Comp. Endocr.* **41**: 408-416.

SCHOENMAKERS, H.J.N. and VOOGT, P.A. (1981). *In vitro* biosynthesis of steroids from androstenedione by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Gen. Comp. Endocr.* **45**: 242-248.

SICA, D. (1980). Sterols from some molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* **65B**: 407-410.

STEIDL, H. (1930). Über die Verbreitung des Weiblichen Sexualhormons. *Arch. Exp. Path. Pharmakol.* **157**: 89.

STREIFF, W. (1967). Étude endocrinologique du déterminisme du cycle sexuel chez un mollusque hermaphrodite protancre *Calyptraea sinensis* (L.). III. mise en evidence par culture *in vitro* de facteurs hormonaux conditionnant l'evolution de la gonade. *Ann. Endocr.* **28**: 641-656.

TESHIMA, S. and KANAZAWA, A. (1972). Comparative study on the sterol composition of marine mollusks. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **38**: 1299-1304.

TESHIMA, S. and KANAZAWA, A. (1973). Biosynthesis of sterols from desmosterol in a mussel, *Mytilus edulis*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **39**: 1309-1314.

TESHIMA, S. and KANAZAWA, A. (1974). Biosynthesis of sterols in abalone, *Haliotis gurneri*, and mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **47B**: 555-561.

VOOGT, P.A. (1973). Investigations of the capacity of synthesizing 3β--sterols in mollusca. X.- Biosynthesis and composition of 3β--sterols in Cephalopoda. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **81**: 401-407.

VOOGT, P.A. (1975). Investigations of the capacity of synthesizing 3β--sterols in mollusca - XIII. Biosynthesis and composition of sterols in some bivalves (Anisomyaria). *Comp. Biochem. Physiol.* **50B**: 499-504.

VOOGT, P.A. (1975). Investigations of the capacity of synthesizing 3β--sterols in mollusca - XIV. Biosynthesis and composition of sterols in some bivalves (Eulamellibranchia). *Comp. Biochem. Physiol.* **50B**: 505-510.

VOOGT, P.A.and DIELEMAN, S.J. (1984). Progesterone and oestrone levels in the gonads and pyloric caeca of the male sea star *Asterias rubens*: a comparison with the corresponding levels in the female sea star. *Comp. Biochem. Physiol.* **79A**: 635-639.

WALTON, M.J. and PENNOCK, J.F. (1972). Some studies on the biosynthesis of ubiquinone, isoprenoid alcohols, squalene and sterols by marine invertebrates. *Biochem. J.* **127**: 471-479.

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO

O padrão da reprodução dos bivalves marinhos pode ser dividido em três fases: gametogénese e vitelogénese; postura e fertilização; desenvolvimento larvar e crescimento. A duração de cada fase deste ciclo varia de espécie para espécie, podendo ser anual, bianual ou contínuo.

O ciclo reprodutivo de numerosos moluscos bivalves foi descrito, entre outros, por Chipperfield (1953), Lubet (1957), Seed (1975) e Kennedy (1976) para *Mytilus edulis*, Narchi (1976) para *Anomalocardia brasiliana*, Yakovlev (1979) para *Crassostrea gigas* (ostra do Pacífico), Wilson e Hodgkin (1967) para cinco espécies de mexilhões da costa ocidental da Austrália. Mas apesar destes estudos não são ainda completamente compreendidas as interacções complexas entre os factores exógenos (disponibilidade de alimentação, temperatura, salinidade, etc.) e os factores endógenos (reservas nutrientes, ciclo hormonal, genotipo, etc.), variáveis essas que determinam o início e a duração das várias fases do ciclo. O desenvolvimento sincronizado dos gâmetas dentro de uma população é de extrema importância para as espécies gonocóricas com fertilização externa, a qual requer um sincronismo na libertação dos gâmetas.

A gametogénese em *Mytilus edulis* é, como nos outros bivalves marinhos de águas frias e temperadas, uma sucessão de acontecimentos que resulta eventualmente na formação de gâmetas maduros. Após a postura segue-se um período de repouso sexual. Estreitamente ligado ao ciclo reprodutivo há um ciclo de síntese e armazenamento de nutrientes de reserva, sobretudo no manto, os quais são mobilizados posteriormente para a gametogénese e manutenção do metabolismo da glândula digestiva (Gabbot, 1976).

Mytilus edulis é um molusco com uma larga distribuição geográfica, constituindo uma espécie privilegiada para o estudo dos factores que regulam o ciclo reprodutivo. Segundo Seed (1976) os mexilhões das águas meridionais mais quentes do Hemisfério Norte desovam mais cedo do que as espécies que vivem mais a norte em águas frias. Giese (1959) e

Sastry (1975 e 1979) concordavam com o princípio de que um limiar de temperatura seria o factor mais importante que influenciaria a gametogénese, actuando como iniciador da emissão de gâmetas, enquanto que para Chipperfield (1953) e Bayne (1975) seria uma taxa de variação da temperatura. Para Chipperfield o período da postura em *Mytilus edulis* ocorria preferencialmente quando a temperatura subia de 9 para 12 °C. Bayne, relacionando a temperatura da água do mar com o tempo, verificou que o começo da postura coincidia sempre com um certo número de "graus-dia", definidos pelo produto da média diária da temperatura pelo número de dias decorridos desde a postura anterior. No entanto Wilson e Hodgkin (1967), num estudo feito em cinco espécies de mitilídeos, se bem que considerassem que a temperatura controlava o ciclo reprodutivo (estação e duração da actividade gametogénica), levantavam a hipótese de haver um outro factor, ainda desconhecido, que regularia o detalhe mais fino deste fenómeno (intensidade e duração da postura e o momento em que devia ocorrer).

Para demonstrar uma relação clara entre a alimentação e a produção de gâmetas maduros, Pieters et al. (1980) estudaram uma população de *Mytilus edulis* no Norte da Europa (Mar do Norte) e verificaram que os máximos encontrados na água para a clorofila **a**, precediam o aumento temporário de nutrientes orgânicos nos tecidos (fase de desenvolvimento da gónada) antes de uma emissão de gâmetas, o que já tinha sido anteriormente observado por Lubet (1959). Igualmente Kautsky (1982), num estudo feito em *Mytilus edulis* do Mar Báltico, verificou que a activação da gónada era iniciada em Outubro-Novembro, provavelmente pelo declínio das temperaturas, prosseguindo muito lentamente durante o Inverno, e atingindo rapidamente o desenvolvimento e maturação dos gâmetas quando a quantidade de alimentos na Primavera era abundante em virtude do crescimento do fitoplâncton.

Com o objectivo de encontrar uma justificação para as variações temporárias no ciclo reprodutivo em *Mytilus edulis* de vários locais da costa do Estados Unidos, Newell et al. (1982) compararam o comportamento de 7 populações de latitudes diferentes utilizando técnicas histológicas e estereológicas associadas. Concluiram não existir qualquer relação com a latitude, uma vez que as maiores diferenças encontradas se situavam em duas populações que habitavam na mesma latitude,

com um máximo de desenvolvimento para ambas no Verão, mas separadas por cerca de três meses. Como não havia diferença na temperatura da água, este autor concluiu ainda que a taxa de desenvolvimento gametogénico não era uma função constante da temperatura, mas poderia ser atribuída a diferenças temporárias e quantitativas na energia fornecida aos animais pela alimentação, já verificado também por Griffiths (1977) em *Choromytilus meridionalis* existente na costa da África do Sul.

Poder-se-à facilmente concluir que para estas espécies uma postura localizada na Primavera teria vantagens sobre uma postura mais extensa, mesmo com o mesmo número de gâmetas libertado. No primeiro caso haverá uma mais forte probabilidade de fertilização e as larvas terão um maior índice de sobrevivência, bem como possibilidade de acumularem as reservas necessárias antes do começo do Inverno (Seed e Brown, 1978).

Lowe et al. (1982) mediram em animais de duas populações, uma com uma postura na Primavera e outra com duas posturas, e também por estereologia, os volumes relativos ocupados por quatro constituintes do manto: as células do tecido conjuntivo vesicular, as células adipogranulares, os gâmetas em desenvolvimento e os gâmetas maduros. Estes autores constataram que na população que apresentava uma postura na Primavera, o volume das células vesiculares e adipogranulares aumentava durante os meses de Verão, seguido de um declínio no Inverno coincidente com o desenvolvimento dos gâmetas até completo amadurecimento. A outra população com duas posturas mostrou um ciclo idêntico desde o fim do Outono até à Primavera, mas após a primeira postura seguiu-se um período de rápido desenvolvimento das células de reserva no fim do Verão, princípio do Outono.

Bayne (1976) classificou a estratégia reprodutiva dos bivalves de acordo com a postura e o ciclo de armazenamento. Dentro deste esquema o *Mytilus edulis* seria considerado uma espécie **conservadora**, quando apresentasse o ciclo normal de gametogénese e vitelogénese durante o Inverno à custa das reservas acumuladas no Verão e a postura na Primavera. Mas também poderia ser considerada uma espécie **oportunista**, quando a gametogénese e a acumulação das reservas ocorressem em simultâneo, resultando numa segunda postura no Verão. Seguindo esta divisão Rodhouse et al. (1984) classificaram duas populações de mexilhões da

costa da Irlanda uma como conservadora e outra como oportunista, por ter duas posturas durante o Verão.

Zandee et al. (1980) verificaram que neste animal o tecido que maiores níveis de glicogénio e lípidos apresentava era o manto, o que estava de acordo com a função que desempenhava na reprodução. O início da gametogénese coincidia com uma perda dos hidratos de carbono e um aumento no conteúdo lipídico, pondo estes autores a hipótese de que tinha havido uma conversão do glicogénio em lípidos na maturação dos oócitos, o que estava também de acordo com a anterior observação feita por Lubet e De Longcamp (1969). Embora a variação do nível dos lípidos seja pequena quando comparada com as proteínas e glicogénio, nem por isso o seu papel fisiológico é menos fundamental. Kluytmans et al. (1985) verificaram nestes animais que nas fases mais avançadas da gametogénese havia um nítido aumento nos lípidos neutros do manto do animal sem que qualquer outra parte do corpo apresentasse a diminuição correspondente, o que levaria a pôr a hipótese de uma síntese *de novo* dos ácidos gordos, o que era sustentado pelo aumento no manto da actividade das duas enzimas envolvidas nessa síntese, a acetil-CoA carboxilase e a sintetase dos ácidos gordos, no período que antecedia a postura e em muito maior grau nas fêmeas que nos machos.

Uma vez iniciada a gametogénese o metabolismo do animal era reduzido ao mínimo para que toda a energia disponível fosse canalizada para o crescimento da gónada, o que foi demonstrado por Kautsky e Wallentinus (1980) que ao medirem a respiração neste período obtiveram os valores mais baixos para o consumo de oxigénio. Posteriormente Yadhav e Lomte (1985) ao estudarem as variações sazonais no consumo de oxigénio num outro molusco lamelibrânquio, *Lamillidens corianus*, descreveram também o efeito da temperatura e da actividade reprodutiva no metabolismo respiratório deste animal, com um máximo da taxa de consumo de oxigénio quando as gónadas estavam completamente maduras e a temperatura era alta, e um mínimo no fim da postura e princípio da recuperação com temperaturas mais baixas.

De entre os compostos bioquímicos que mais influenciam a gametogénese destacam-se o glicogénio e as proteínas. Após os trabalhos de Bayne et al. (1982), ficou bem demonstrado que quando o nível de glico-

génio do animal era alto e este estava num estado primário de desenvolvimento, este composto era usado como substrato metabólico, não havendo desenvolvimento da gónada. Posteriormente, num estado mais avançado da gametogénese, em que o nível de hidratos de carbono era mais reduzido, eram as proteínas que serviam como principal fonte de energia, sendo nestas circunstâncias o glicogénio conservado possivelmente para o ciclo de armazenamento dos lípidos nos tecidos somático e germinativo como tinha sido descrito por Herlin-Houteville e Lubet (1975).

Mas dentro dos factores endógenos há ainda que referir a contribuição fundamental do sistema nervoso central (S.N.C.) no ciclo reprodutivo anual dos moluscos, a qual começou a ser estudada sobretudo por Gabe (1955), Lubet (1955 e 1959) e Antheunisse (1963). Em *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis* estes autores verificaram uma evacuação massiva do produto de secreção das células neurossecretoras do S.N.C., sempre antes do início da postura, seguindo-se de novo uma secreção nessas células dos gânglios cerebróides durante a fase de restauração da gónada. Ainda Lubet (1966), comparando animais descerebrados com animais intactos, viu que havia uma diferença entre eles, e sobretudo nas fêmeas, na repartição do RNA citoplasmático.

Prosseguindo na mesma linha de investigação e usando corantes sinalépticos, Illanes-Bucher e Lubet (1980) puseram em evidência em microscopia fotónica quatro tipos de células neurossecretoras: a_1, a_2, a_3 e a_4. As células do tipo a_1 eram as mais numerosas e a sua distribuição era de 75% para os gânglios cerebróides e 5% para os gânglios viscerais. A sua actividade secretora seguia de um modo significativo a evolução gametogénica e a libertação dos produtos de neurossecreção precedia sempre a multiplicação da linha germinativa.

Lubet e Mathieu (1982), alargando agora este estudo a outros moluscos pelecípodes, como as ostras *Cassostrea gigas* e *Ostrea edulis*, verificaram que o desencadeamento da gametogénese durante o ciclo reprodutivo anual estava sob a acção de alguns factores neuroendócrinos libertados pelos gânglios cerebropleurais: um factor **mitótico**, um factor **meiótico**, um factor **pré-vitelogénico** e um factor **vitelogénico** desencadeador da vitelogénese.

O controlo endócrino da reprodução foi estudado em moluscos pulmonados como o caracol *Lymnaea stagnalis*, uma espécie hermafrodita de água doce. Geraerts e Joosse (1975) evidenciaram nestes animais o papel exercido pelos corpos dorsais, orgãos ligados à superfície dos gânglios cerebrais, tendo mostrado que a sua remoção provocava uma diminuição na vitelogénese. Geraerts e Bohlken (1976), também em *Lymnaea stagnalis*, demonstraram a existência de outro grupo de células dos gânglios cerebrais, as células do grupo caudo dorsal que exerciam um controlo na ovulação. Animais nos quais estas células tinham sido cauterizadas, apresentavam uma inibição na deposição dos ovos. A posterior injecção de homogeneizados de uma zona do cérebro estreitamente ligada a estas células - as comissuras cerebrais - induzia a libertação dos ovos em todos os animais cauterizados. Widjenes e Runham (1976) verificaram que a remoção dos corpos dorsais de um outro molusco pulmonado, a *Agriolimax reticulatus*, não tinha qualquer efeito na espermatogénese ou nos orgãos acessórios masculinos, mas a maturação dos ovos era retardada, resultando no aumento do número de pequenos oócitos bem como no retardamento do desenvolvimento dos orgãos acessórios femininos.

Nos pulmonados terrestres também a endocrinologia da sexualidade e da reprodução tem sido largamente estudada. Guyard (1971) e Gomot (1974), num estudo ultra-estrutural da glândula hermafrodita (*ovotestis*) do caracol *Helix aspersa*, não encontraram qualquer distinção nas duas linhas germinativas, e portanto quer os espermatócitos quer os oócitos ou as células auxiliares (de reserva ou foliculares) pareciam todas elas diferenciarem-se a partir de células idênticas. Gomot em 1982, recorrendo a métodos de castração, ao seccionamento dos tentáculos oculares e a transplantações e culturas *in vitro*, demonstrou que a diferenciação sexual e a reprodução nestes animais eram regulados por um sistema de várias hormonas. O cérebro e as glândulas anexas (corpos dorsais) ou os orgãos sensoriais agiam directamente na glândula hermafrodita e por vezes na via genital. Também a gónada segregava substâncias que agiriam directamente na via genital, ou por intermédio do cérebro. Mais tarde Gottfried e Dorfman (1970), no decurso de pesquisas sobre a reprodução da lesma *Ariolimax californicus*, um protandrico hermafrodita, procuraram verificar se os esteróides estariam envolvidos na interacção do tentáculo óptico sobre a gónada. Foram

seguidas as alterações histológicas que ocorriam na glândula hermafrodita dos animais imaturos quando lhes eram removidos os tentáculos ópticos, ou pela administração de esteróides e de metopirona na presença e na ausência dos tentáculos ópticos. Verificaram que a remoção dos tentáculos induzia a espermatogénese nos animais jovens, atingindo estes uma fase comparável à dos animais adultos. Resultados idênticos foram também obtidos pela administração de esteróides em C_{19} (desidroepiandrosterona e 11-cetotestosterona) que a gónada parecia segregar. A metopirona, quando administrada a animais machos jovens, causava uma progressiva desorganização da espermatogénese. A administração de esteróides a animais privados dos tentáculos não alterava o resultado, levando estes autores a supor que os esteróides segregados pela gónada interviriam modificando o efeito dos tentáculos ópticos sobre a glândula hermafrodita.

Após a descoberta do papel das hormonas esteróides na diferenciação sexual dos vertebrados, vários trabalhos foram realizados em moluscos gastrópodes com o fim de saber se estas hormonas seriam capazes de influenciar nestes animais a diferenciação sexual e a formação de gâmetas. Referiremos entre outros os trabalhos de Aubry (1962), que, fazendo injecções intramusculares de soluções oleosas de esteróides (estradiol, testosterona e progesterona) em *Lymnaea stagnalis*, *Helix pomatia* e *Helix aspersa*, verificou que a injecção de testosterona favorecia a espermatogénese e inibia e ovogénese, enquanto o estradiol tinha uma acção inversa. A progesterona activava ao mesmo tempo a linha masculina e feminina. Para estudar também a influência dos esteróides na glândula hermafrodita de *Helix aspersa*, Gomot (1974) fez culturas deste orgão na presença do 17β-estradiol e da desidroepiandrosterona, verificando que a influência dos esteróides era variável, dependendo, por um lado do estado fisiológico do animal (fase de repouso ou de actividade), e por outro da natureza do esteróide ensaiado. Nas doses utilizadas o 17β-estradiol provocava muito rapidamente a atresia dos espermatócitos e o esvaziamento dos ácinos da gónada. A desidroepiandrosterona permitia por mais tempo a evolução das duas linhas gametogénicas e permitia a multiplicação das espermatogónias durante os primeiros dias de cultura, não apresentando acção selectiva sobre os oócitos. Gomot pôs a hipótese de que a acção destes compostos, quando

injectados no caracol, seria do tipo indirecto por influência sobre o metabolismo ou sobre as correlações endócrinas.

Mas para além da acção *in vitro* dos esteróides, também foi estudada a produção de esteróides em C_{21} e C_{19} em vários gastrópodes usando como precursor o colesterol (Voogt, 1973 e Idler et al., 1978). Estes autores observaram nas glândulas hermafroditas de *Lymnaea stagnalis* a presença de células de Sertoli com as mesmas características das células produtoras de esteróides nos vertebrados, e notaram que as alterações na estrutura destas células coincidia com alterações na actividade da enzima 3β-hidroxiesteróidedesidrogenase (3β-HSD). Por outro lado demonstraram que o S.N.C., e mais particularmente os corpos dorsais, eram assumidamente orgãos endócrinos com uma ultra-estrutura caracterizada por um número elevado de mitocôndrias e gotículas de lípidos, características estas mais das células produtoras de esteróides do que das células secretoras de proteínas.

Com base nestes resultados Krusch et al. (1979) procuraram estabelecer uma relação funcional entre os corpos dorsais e a glândula hermafrodita de *Helix pomatia*. Para isso incubaram estes dois orgãos com pregnenolona e desidroepiandrosterona e obtiveram a conversão da primeira em progesterona e da segunda em androstenediona, o que provava a existência nos corpos dorsais e glândula hermafrodita da enzima 3β-HSD. Conforme o estado fisiológico do animal uma ou outra das reacções era preferencialmente catalisada. Assim, antes da deposição dos ovos dava-se sobretudo a formação da androstenediona, e depois da deposição dos ovos passava a ser maior a conversão da pregnenolona em progesterona na glândula hermafrodita.

Mas de todos os invertebrados marinhos aquele em que mais se avançou na demonstração da presença e depois no relacionamento dos esteróides com o ciclo reprodutivo anual, foi sem dúvida num equinoderme: a estrela-do-mar, *Asterias rubens*.

Primeiro foi demonstrada a capacidade de síntese de esteróides nos ovários e no ceco pilórico (*cecum pyloricum*) destes animais, entre outros por Schoenmakers (1977 e 1979) e Schoenmakers e Voogt (1981). Schoenmakers (1980) relacionou a síntese de esteróides por estes orgãos

durante o ciclo reprodutivo com o máximo de actividade da enzima 3β-HSD no estado primário de desenvolvimento (fase 1), tendo evidenciado nos ovários células com características das células secretoras de esteróides. Na continuação desta linha de pesquisa Schoenmakers e Dielman (1981) dosearam os níveis de progesterona e de estrona nos ovários e no ceco pilórico destes animais durante o ciclo reprodutivo, e verificaram que os níveis de progesterona eram altos no estádio primário de desenvolvimento do ovário, diminuindo em seguida, enquanto no ceco pilórico era encontrada a mesma variação, mas com um segundo pico imediatamente antes da postura. Para a estrona, embora as quantidades doseadas fossem muito menores, foi também encontrado um máximo na fase 1 coincidente com o começo da vitelogénese. Relacionando ainda a quantidade de proteína com os níveis de estrona, estes autores levantaram a hipótese de que a estrona, e possivelmente outros estrogénios, teriam influência na biossíntese das proteínas e possivelmente na sua incorporação nos oócitos. Schoenmakers et al. (1981) observaram que quando fêmeas de *Asterias rubens*, nas fases 1 e 2 do ciclo reprodutivo, eram tratadas com 17β-estradiol, se dava uma diminuição no peso do ceco pilórico e um rápido aumento dos ovários, sendo também acelerada a oogénese e activada a vitelogénese, podendo deduzir-se que os processos de síntese ocorrentes no ceco pilórico e subsequente maturação dos gâmetas eram afectados pelos estrogénios.

Van der Plas et al., (1982) testaram *in vitro* os efeitos do 17β-estradiol nos processos de síntese do ceco pilórico do mesmo equinoderme e verificaram um significativo aumento do RNA nas fêmeas.

Mas também nos machos Voogt e Dielman (1984) quantificaram os níveis de progesterona e estrona ao longo do ciclo reprodutivo e obtiveram os mesmos resultados que nas fêmeas. A progesterona e a estrona nos testículos estavam envolvidas na regulação da gametogénese. Tal como nas fêmeas, os níveis de progesterona eram mais elevados no ceco pilórico que nas gónadas, sendo os níveis de estrona próximos. O começo de um novo ciclo coincidia também neste caso com uma diminuição dos níveis de progesterona e um aumento dos níveis de estrona no ceco pilórico, o que levou a supor que estes dois esteróides teriam neste orgão o papel de promover os materiais necessários à gametogénese.

A revisão da bibliografia existente mostra pois que o ciclo anual da reprodução está na dependência de diversos factores não só de natureza exógena como também de natureza endógena, de entre os quais são de realçar as hormonas segregadas pelo S.N.C. ou pelas células da própria gónada, as quais determinam em última análise o período e a intensidade da gametogénese. Começa a ter fundamento a ideia de que os esteróides, cuja intervenção na reprodução dos vertebrados é bem conhecida, têm também nos invertebrados marinhos, e em particular nos moluscos e equinodermes, um papel importante na evolução do ciclo reprodutivo.

Em face destes estudos e após termos evidenciado a presença de alguns esteróides endógenos em *Mytilus*, como foi descrito na primeira parte do trabalho, propusemo-nos estudar a variação anual de alguns destes esteróides e tentar relacioná-la com as fases de desenvolvimento da gónada.

Secundariamente procurou-se analisar também a acção de outros factores, quer físicos quer químicos, que teriam efeito na programação precisa do início e duração das diversas fases de desenvolvimento sexual, de maneira a resultar um sincronismo na maturação das gónadas dentro de uma mesma população de animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

A - TÉCNICAS EFECTUADAS NO ANIMAL INTEIRO

1 - ANIMAIS

Foram analisadas 17 amostras de animais do género *Mytilus* colhidas de Dezembro de 1982 a Novembro de 1983 de uma jangada situada na Ria de Aveiro, Costa Nova (40° 38' S, 8° 45' W), localizada a poucos metros da margem, numa zona de cerca de 5 metros de profundidade. A fixação das larvas às cordas tinha ocorrido na Primavera de 1981. Após a colheita, os animais foram imediatamente transportados para o laboratório e mantidos num aquário com água salgada, à temperatura ambiente, com arejamento, sem adição de alimento durante um período máximo de 24 horas.

2 - DISSECAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais dissecados apresentavam um comprimento compreendido entre 50 e 70 mm. Foram separados em dois lotes de 15 a 20 animais cada, segundo o sexo. Para tal, depois de abertos, foi feito um esfregaço a fresco com um pequeno fragmento de cada manto, que foi de seguida observado ao microscópio em ampliação média. A identificação das fêmeas foi feita com base na presença de oócitos e a dos machos pela presença de espermatozóides, facilmente identificáveis. Foram rejeitados todos os animais que não ofereciam uma forte resistência à abertura das conchas, bem como os animais onde foi detectada a presença de parasitas.

3 - OBTENÇÃO DOS LIPIDOS TOTAIS

Os animais, machos e fêmeas, depois de pesados foram liofilizados.

Depois de novamente pesados, para a obtenção do peso seco, foi calculada a percentagem de água. Seguiu-se a extracção dos lípidos totais segundo o método de Bligh e Dyer (1959) como foi descrito no Capítulo I.

4 - EXTRACÇÃO DOS ESTEROIDES

O extracto lipídico foi homogeneizado com pequenos volumes de metanol a 80% (v/v), até um total de 120 ml. Os extractos metanólicos obtidos foram distribuídos por tubos de centrífuga e conservados durante 48 h à temperatura de -20 °C. Ao fim deste tempo foram centrifugados a 2 000 r.p.m. numa centrífuga SORVALL RC-5, durante 10 min, também a uma temperatura próxima daquela. Os sobrenadantes foram separados e guardados. Os precipitados (contendo os lípidos) foram lavados com um pequeno volume de metanol a 80%, centrifugados nas mesmas condições e os sobrenadantes adicionados aos obtidos anteriormente. A totalidade dos extractos foi evaporada a baixa pressão à temperatura de 50 °C, e a fracção aquosa resultante evaporada num banho de areia à mesma temperatura e em atmosfera de azoto. Os extractos resultantes (um para os machos e outro para as fêmeas) foram novamente deslipidificados seguindo a mesma técnica.

5 - SEPARAÇÃO DOS ESTERÓIDES NEUTROS E DOS ESTROGÉNIOS CROMATOGRAFIA EM RESINA TROCA IÓNICA DOWEX AG1-X2

Obtidos os extractos metanólicos, os esteróides neutros foram separados dos esteróides aromáticos. Com este objectivo o extracto foi suspenso em 5 ml de água destilada, e de seguida foi feita a extracção dos esteróides com 4x10 ml de clorofórmio.

Os extractos clorofórmicos foram evaporados à secura, a pressão reduzida, e retomados com 1 ml de metanol para serem posteriormente passados pela coluna troca iónica.

Tal como já foi descrito, a resina foi previamente lavada e transformada na forma de bicarbonato. A solução metanólica foi introdu-

zida na coluna de vidro de 1×12 cm cheia até à altura de 4 cm com a resina, e foi depois eluída primeiro com 15 ml de metanol, que arrastou os esteróides neutros, e depois com 25 ml de metanol a 80%, que arrastou os estrogénios.

6 - CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC)

As quatro fracções metanólicas, duas para os machos e duas para as fêmeas, foram levadas a extracto seco e submetidas a uma separação dos esteróides por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

Na primeira fase do trabalho separámos os esteróides neutros e os estrogénios por Cromatografia em Camada Fina em gel de sílica, mas nesta fase optámos pelo HPLC, por ser um método de separação e quantificação mais simples, não destrutivo, e sobretudo muito mais rápido. Por estes motivos tem sido uma técnica largamente utilizada. Citamos somente alguns dos trabalhos entre os vários publicados neste campo: Aten et al. (1982), Heftmann e Lin (1982), Kessler (1982), Newton et al. (1982), Garignan et al. (1983) e Yamada e Aizawa (1983).

O sistema era constituído por um cromatógrafo VARIAN modelo 5 000, equipado com um detector de UV modelo VARI-CHROM VARIAN e uma coluna MICROPAK Si-10 de 4 mm DI × 30 cm.

Os padrões de progesterona, Δ^4-androstenediona e testosterona foram preparados a partir de soluções 5 mM, e para o estradiol e estrona a partir de soluções 2,5 mM, feitas na fase móvel. O composto usado como padrão interno, a resorcina, foi também feito a partir de uma solução-mãe 5 mM.

A fase móvel foi a mesma para os dois grupos de esteróides, sendo constituída pelos solventes A e B na proporção de 90% de A para 10% de B, com a seguinte constituição:

A - Diclorometano : Acetato de Etilo : Isopropanol (93:6:1)
B - n-Hexano : Isopropanol (99,9:0,1)

Os reagentes foram previamente desgaseificados a pressão reduzida antes de serem utilizados.

As amostras foi adicionada uma quantidade de padrão interno entre 5 e 15 µg e evaporado o solvente em atmosfera de azoto, sendo o extracto dissolvido num pequeno volume da fase móvel de maneira a ser possível fazer duas injecções de 20 µl cada.

Para os esteróides neutros as condições de trabalho foram as seguintes: temperatura 29 °C, fluxo começando a 0,8 ml/min até aos 10 minutos, depois aos 15 minutos 1,0 ml/min e aos 20 minutos 1,5 ml/min, a que correspondeu uma pressão entre 20 e 36 atm. A detecção em UV foi feita a um comprimento de onda de 254 nm e com uma sensibilidade de 0,2.

Para o estradiol e a estrona a temperatura foi também de 29 °C e a variação de fluxo foi de 0,7 ml/min no início até aos 7 minutos, de 1,0 ml/min aos 10 minutos e 1,5 ml/min aos 15 minutos, a que correspondeu uma variação de pressão entre 20 e 46 atm. A detecção foi feita a 280 nm e a uma sensibilidade de 0,1.

As áreas dos picos foram quantificadas usando um integrador electrónico DATA PROCESSOR CHROMATOPAC C-R1A. Os compostos foram identificados em função dos seus tempos de retenção relativos em relação a padrões de referência.

A concentração dos vários esteróides na amostra foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade} = \left(\frac{F_1 \, A_{AM}}{A_{PI}} + F_2 \right) \times \frac{P_{PI}}{P_{AM}} \times 100$$

A_{AM} - área do pico referente ao esteróide
A_{PI} - área do pico referente ao padrão interno
F_1 - factor de resposta
F_2 - factor de resposta
P_{PI} - peso do padrão interno
P_{AM} - peso da amostra

Os factores F_1 e F_2 foram calculados pelo método da curva com dois pontos de calibração com factores de resposta desconhecidos, relacionando as áreas dos picos obtidos para as duas concentrações do padrão do esteróide com a área e a concentração do padrão interno. Para os esteróides neutros as concentrações usadas foram de 200 e 400 ng, e para o padrão interno 11,4 µg; para os estrogénios as concentrações foram de 417 e 833 ng e para o padrão interno 3,3 µg.

Os volumes eluídos da coluna foram recolhidos em tubos de vidro, dentro de intervalos de tempo estabelecidos pelos tempos de retenção dos padrões, e posteriormente evaporados num sistema de vácuo, ou a 45 °C em atmosfera de azoto quando os volumes eram menores.

7 - CROMATOGRAFIA GÁS-LIQUIDO (GLC)

Os esteróides com grupos hidroxilos foram derivatizados nos seus éteres trimetilsililados. Aos extractos referentes à testosterona, estradiol e estrona adicionaram-se 80 µl de BSTFA (bis-(trimetisilil)--trifluoracetamida) e 20 µl de TMCS (trimetilclorosilano). A sililação da testosterona foi feita durante 1 hora a 60 °C, e os dois outros durante cerca de 12 h a 40 °C. Os extractos da progesterona e da androstenediona foram retomados com 100 µl de diclorometano e injectados sem qualquer derivatização.

Foram também preparados padrões de referência de cada um dos esteróides a partir de soluções-mãe feitas em etanol. Quer os padrões quer as amostras foram adicionados de 10 µl de padrão interno, o epicoprostanol (5β-colestano-3α-ol), preparado também em solução etanólica.

A cromatografia foi feita num cromatógrafo VARIAN modelo 3700, equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna de vidro de 2,0 m × 1/4 in DE × 2 mm DI, cheia com a fase estacionária OV_{17} a 3% e a fase SP-2100 a 3%, sendo o gás vector o azoto com um fluxo de 120 ml/min. O fluxo do hidrogénio e do ar foi de 120 e 300 ml/min, respectivamente. O volume injectado na coluna foi de 2 µl quer para as amostras quer para os padrões, e a temperatura programada para uma subida de 2 °C/min, começando a 230 °C e acabando a 270 °C.

As áreas dos picos foram quantificadas num integrador HEWLETT PACKARD modelo 3380 A, pelo método do padrão interno, a partir da seguinte equação:

$$\text{Quantidade} = \frac{A_{AM} \times F_{AM}}{A_{PI} \times F_{PI}} \times P_{PI} \times XF$$

A_{AM} - área do pico referente ao esteróide
A_{PI} - área do pico referente ao padrão interno
F_{AM} - factor de resposta referente ao esteróide
F_{PI} - factor de resposta referente ao padrão interno
P_{PI} - quantidade do padrão interno

Os factores F_{AM} e F_{PI} foram calculados pela razão entre as áreas dos picos e as quantidades dos padrões e do padrão interno. As quantidades injectadas dos padrões e do padrão interno foram de 20 ng em 2 µl, respectivamente.

8 - EXAME HISTOLÓGICO. DETERMINAÇÃO DO INDICE DA GÓNADA

Só o exame microscópico de cortes da gónada permite uma informação detalhada do desenvolvimento, postura, fagocitose e outras alterações histológicas importantes durante o ciclo reprodutivo.

Os animais foram escolhidos ao acaso dentro da totalidade das amostras. O sexo foi determinado por meio de um esfregaço de um fragmento do manto. Foram assim separados 5 machos e 5 fêmeas, que foram fixados em líquido de BOUIN durante dois dias. Depois de desidratados em três banhos de álcool etílico de concentrações crescentes e num banho de xilol, foram impregnados e incluídos em parafina. Os cortes com uma espessura de 5 µ a 10 µ foram montados em lâminas, desparafinados e corados com hematoxilina e eosina.

Os cortes histológicos foram classificados em séries de desenvolvimento e postura, adaptadas a partir dos sistemas de classificação de Chipperfield (1953), Lubet (1957, 1959) e Wilson e Hodgkin (1967).

Seguimos de muito perto a classificação feita por Seed (1975) para *Mytilus edulis*, introduzindo-lhe ligeiras modificações. Atribuimos na totalidade oito fases, repartidas em quatro fases de desenvolvimento, três fases de postura e uma de repouso sexual, como passamos a descrever:

Fase de repouso sexual

Fase 0: Nesta fase não é observado qualquer traço de sexualidade. Inclui os animais que tiveram uma postura completa. Neste caso o manto pode apresentar-se fino e transparente ou espesso e opaco, de acordo com as condições de alimentação. É durante este período que as reservas de glicogénio e gordura se acumulam no tecido conjuntivo.

Fases de desenvolvimento

Fase d_1: Esta fase é caracterizada pelo começo da gametogénese, aparecendo ilhas de tecido germinativo na matriz do tecido conjuntivo, ainda bastante denso. Não se encontram nesta fase nem oócitos maduros nem espermatozóides.

Fase d_2: Começam agora a aparecer gâmetas maduros nos folículos, embora estejam ainda ocupados pelos estados primários da gametogénese.

Fase d_3: Ocorre um aumento nítido da massa da gónada. É uma fase de gametogénese rápida, onde aproximadamente metade de cada folículo está ocupado por gâmetas maduros e a outra metade por estados primários.

Fase d_4: É atingida a proliferação máxima da gónada. Os estados primários de desenvolvimento estão agora restritos a uma banda à volta da periferia dos folículos, havendo, por conseguinte, uma preponderância de gâmetas maduros.

Os oócitos estão comprimidos, apresentando uma configuração poligonal, enquanto na gónada masculina os folículos estão

distendidos com esperma morfologicamente maduro e activo.

Fases de postura

Fase s_3: Embora os folículos tenham ainda muitos gâmetas maduros, a postura está agora em progresso. Isto reflecte-se pela redução da densidade dos espermatozóides e pela forma mais arredondada dos oócitos, uma vez que a pressão dentro dos folículos é reduzida.
É uma fase em alguns aspectos semelhante à fase de desenvolvimento d_3, mas, contrariamente a esta, apresenta poucas fases de desenvolvimento primário de gametogénese.

Fase s_2: Diminui a área do manto ocupada pelo tecido genital. Os folículos apresentam muito poucos gâmetas maduros.

Fase s_1: Os oócitos residuais e os espermatozóides que estão ainda presentes podem ver-se a sofrer uma lise pelos fagócitos amoebóides. O centro dos folículos está muitas vezes cheio de um material resultante da citólise.

Para cada colheita efectuada foi calculado o índice médio da gónada, o qual define mais ou menos a condição reprodutiva da população, e que se obteve multiplicando o número de animais classificados em cada fase pelo número dado à fase, e dividindo o produto obtido pelo número total de animais analisados.

O Índice de Maturação da gónada foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IM = \frac{\Sigma\ (n \times F)}{N}$$

n - nº de animais nas fases F
N - nº total de animais analisados

O resultado obtido varia de 0, quando todos os animais se apresen-

tam vazios (sem traço de sexualidade), até um máximo de 4, quando todos os animais se apresentam na fase mais avançada do ciclo reprodutivo. Um aumento no índice da gónada demonstra um período de desenvolvimento, enquanto uma descida indica que a emissão de gâmetas está a decorrer.

B - TÉCNICAS EFECTUADAS EM MANTOS ISOLADOS

1 - ANIMAIS

Os especímenes de *Mytilus* foram colhidos mensalmente na Ria de Aveiro, de Janeiro a Dezembro de 1986, e conservados como já foi descrito na página 51.

2 - DISSECAÇÃO DOS ANIMAIS

Depois do animal aberto foi-lhe retirado um pequeno fragmento do manto, do qual se fez um esfregaço e se observou ao microscópio para a determinação do sexo. O animal inteiro, separado das valvas, foi pesado, e os mantos separados e novamente pesados e conservados a -20 °C antes da homogeneização.

3 - DOSEAMENTO DAS PROTEINAS

As proteínas totais foram determinadas em triplicado, de acordo com o método de Lowry et al. (1951).

4 - DETERMINAÇÃO DOS LIPIDOS TOTAIS

Os lípidos totais foram medidos pelo método de Bligh e Dyer (1959), já descrito para o animal inteiro.

5 - EXTRACÇÃO DOS ESTERÓIDES

Após descongelamento das amostras dos mantos (machos e fêmeas), estas foram homogeneizadas com tampão PBS na proporção de 2,5 ml de tampão para 6 g de tecido. A homogeneização foi feita num homogeneizador POTTER-ELVEJHAM, durante 2 min e a 0 °C, seguida de uma sonicação durante 30 s num sonicador MSE. Do homogeneizado obtido foi retirada uma alíquota para a determinação das proteínas, e o restante dividido em três fracções que foram extraídas com diclorometano (Merck) para posterior doseamento da progesterona, testosterona e estradiol.

A extracção foi efectuada de acordo com o quadro seguinte:

	PROGESTERONA (ml)	TESTOSTERONA (ml)	ESTRADIOL (ml)
volume de homogeneizado	1,5	1,5	2,5
volume de diclorometano	2×15	2×15	2×25

Os extractos orgânicos resultantes da extracção foram evaporados sob vácuo até à obtenção de resíduo seco.

6 - DOSEAMENTO DA PROGESTERONA, TESTOSTERONA E ESTRADIOL POR RADIOIMUNOENSAIO (R.I.A.)

Foi usado o conjunto de reagentes COAT-A-COUNT da DPC (Diagnostic Products Corporation) para o doseamento da progesterona, testosterona e estradiol nos mantos de *Mytilus*, macho e fêmea.

O fundamento do método utilizado é idêntico ao do RIA descrito no Capítulo I para o doseamento de esteróides em extractos lipídicos do animal inteiro, mas mais simples e de mais rápida execução.

O princípio é igual para os três esteróides e baseia-se no seguinte: o anticorpo específico para cada esteróide encontra-se imobilizado nas paredes de tubos de propileno. O esteróide marcado com ^{125}I com-

pete, num intervalo de tempo fixo, com o esteróide que se encontra na amostra, para os locais de ligação do anticorpo. O tubo é em seguida decantado para separar o esteróide ligado do esteróide livre, e contado num contador gama. A quantidade de esteróide presente é calculada a partir da curva-padrão.

A metodologia dos tubos de propileno, revestidos interiormente com o anticorpo, oferece vantagens significativas:

- Não necessita de qualquer extracção ou cromatografia prévia, nem utiliza qualquer centrifugação;
- Os tubos podem ser completamente decantados sem perda do material ligado ao anticorpo;
- Os padrões são obtidos a partir de soro humano e na concentração de 0,1 a 40 ng/ml para a progesterona, de 0,3 a 30 ng/ml para a testosterona e de 20 a 3 600 pg/ml para o estradiol, sendo apresentados na forma líquida;
- O marcador apresenta uma alta actividade específica com um total de contagens de aproximadamente 50 000 cpm a 60 000 cpm após iodação. O máximo de ligação é aproximadamente 35 a 45%;
- A exactidão do método é extensiva a uma larga banda de valores para cada um dos esteróides. O teste da ligação não específica (NSB) e o branco poderão ser omitidos;
- Os anti-soros são altamente específicos, com reacções cruzadas muito fracas. No caso particular da testosterona a reacção cruzada com a diidrotestosterona é menor do que 10%;
- A sensibilidade obtida por este método é muito elevada.

Para o doseamento dos três esteróides (progesterona, testosterona e estradiol) nos mantos do macho e da fêmea de *Mytilus* foram usados os extractos secos obtidos em 5.

Estes três extractos foram suspensos em 0,5 ml de tampão de glicerina pH 7,4 e bem homogeneizados por agitação.

A sequência usada para a técnica foi a seguinte:

1 - Tubos normais - marcaram-se 4 tubos de propileno, dois com T (contagem total) e os outros dois com **NSB** (ligação não espe-

cífica).

Tubos contendo anticorpo - marcaram-se 12 a 14 tubos contendo o anticorpo **A** (máximo de ligação - MB) e de **B** a **F** (G), todos eles em duplicado. Marcaram-se ainda tubos contendo o anticorpo, e também em duplicado, para os controlos e para as amostras.

PADRÕES	**PROGESTERONA** (ng/ml)	**TESTOSTERONA** (ng/ml)	**ESTRADIOL** (pg/ml)
A (MB)	0,0	0,00	0
B	0,1	0,30	20
C	0,5	1,00	50
D	2,0	3,00	150
E	10,0	10,00	500
F	20,0	30,00	1 800
G	40,0	-	3 600

2 - Juntaram-se 100 µl ou 25 µl, conforme o esteróide a dosear, do padrão 0 aos tubos A e NSB, e 100 µl de cada um dos outros padrões de B a G para os respectivos tubos, bem como do controlo e das amostras.

3 - Adicionaram-se 1,0 ml de ^{125}I Progesterona, ^{125}I Testosterona ou ^{125}I Estradiol em tampão, a cada tubo. Agitaram-se de seguida no vortex.

4 - Deixaram-se incubar 3 horas à temperatura ambiente (estradiol) ou 3 horas a 37 °C (testosterona).

5 - Decantaram-se completamente todos os tubos.

6 - De seguida contaram-se os tubos durante 1 min num contador gama ANSR ABBOTT.

Para calcular as concentrações dos esteróides a partir da curva de calibração, foi primeiro calculado para cada par de tubos a diferença

entre os cpm contados e a média dos cpm referentes a NBS.

Contagem Líquida = média cpm - média cpm NBS

A determinação da ligação para cada par de tubos expressa em percentagem do máximo de ligação (MB) referente à contagem do tubo A, corrigida do NBS e tomada como 100%, é apresentada do seguinte modo:

$$\text{Percentagem de ligação} = \frac{\text{Contagem Líquida}}{\text{Contagem Líquida MB}} \times 100$$

RESULTADOS

As variações sazonais das temperaturas e salinidades da água da Ria de Aveiro (Costa Nova), durante os meses de colheita das amostras, estão representadas nas figuras 1 e 2.

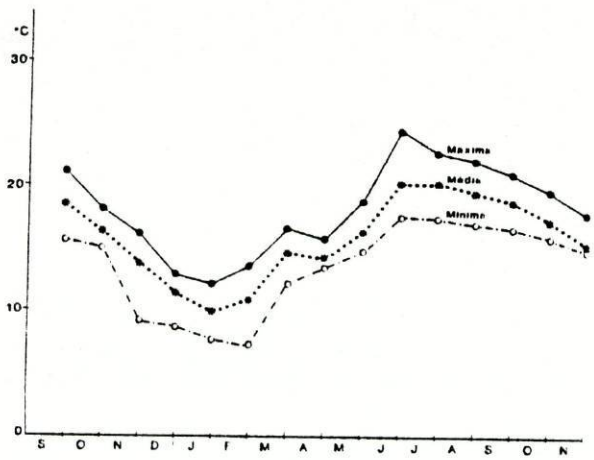


FIG. 1 - Variações sazonais das temperaturas (°C) máxima, mínima e média medidas na Ria de Aveiro (Costa Nova), de Setembro de 1982 a Novembro de 1983

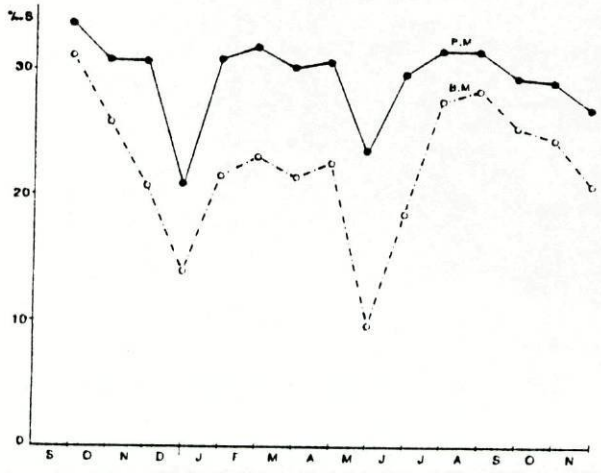


FIG. 2 - Variações sazonais da salinidade (‰ S) da preia-mar e baixa-mar na Ria de Aveiro (Costa Nova), de Setembro de 1982 a Novembro de 1983

A temperatura média é o valor médio de todas as medições, e a máxima e a mínima, a média das temperaturas máximas e mínimas medidas ao longo de cada mês.

As temperaturas mais elevadas foram medidas nos meses de Julho e Agosto e as mais baixas no mês de Fevereiro.

O gráfico das salinidades mostra pequenas flutuações nos valores, excepto nos meses de Dezembro e Maio, correspondendo provavelmente a uma maior quantidade de água doce que penetrou na Ria. Estes valores foram sempre medidos na hora de viragem das marés (máximos da preia-mar e baixa-mar), e sempre no mesmo dia da semana [1].

---

(1) Estes valores foram-nos facultados pela Drª. Ana Teia dos Santos do Centro de Investigação Pesqueira do INIP, em Aveiro.

Nos quadros 1 e 2 estão caracterizados os animais de experiência relativamente a alguns parâmetros físicos e químicos.

Observando as figuras 3 e 4, construídas com estes resultados, verificamos que o peso seco médio apresenta uma diminuição progressiva nos valores medidos durante o Inverno e a Primavera, mas imediatamente a seguir ao mínimo medido em Agosto (máximo da postura) observa-se um rápido desenvolvimento dos tecidos, correspondendo a uma época de crescimento e recuperação das gónadas à custa da alimentação mais abundante nesta altura do ano.

A percentagem de água atingiu o mínimo em Outubro e Novembro quando o peso seco atingiu o seu máximo.

QUADRO 1 - Peso fresco médio (g), peso seco médio (g) e comprimento médio (± DP) (cm)

Data das colheitas	Nº de animais		PESO FRESCO MÉDIO (g)		PESO SECO MÉDIO (g)		COMPRIMENTO MÉDIO (cm)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
14.12.82	16	13	6,19	6,10	0,74	0,93	5,90 ± 0,50	5,96 ± 0,70
4.01.83	16	23	3,83	3,70	0,60	0,63	5,82 ± 0,30	5,89 ± 0,36
24.01.	18	13	5,67	5,48	0,91	0,98	5,76 ± 0,26	5,93 ± 0,27
12.02.	20	18	5,37	4,14	0,90	0,76	5,56 ± 0,25	5,56 ± 0,20
7.03.	17	15	4,54	3,92	0,68	0,60	5,76 ± 0,63	5,93 ± 0,46
28.03.	17	16	5,96	4,66	0,83	0,67	5,98 ± 0,73	5,93 ± 0,56
19.04.	17	16	6,46	5,74	0,80	0,75	6,61 ± 0,43	6,53 ± 0,35
9.05.	20	19	4,61	4,40	0,57	0,57	5,50 ± 0,58	5,50 ± 0,51
30.05.	25	26	4,06	3,22	0,53	0,47	5,20 ± 0,41	5,28 ± 0,49
20.06.	24	20	3,98	3,57	0,56	0,54	5,24 ± 0,36	5,16 ± 0,51
11.07.	22	23	4,97	3,84	0,65	0,52	5,64 ± 0,54	5,26 ± 0,87
1.08.	17	13	3,44	3,13	0,56	0,54	5,56 ± 0,63	5,37 ± 0,55
22.08.	15	15	4,34	4,42	0,73	0,78	5,60 ± 0,60	5,78 ± 0,68
20.09.	15	13	5,60	4,80	0,90	0,91	5,68 ± 0,44	5,52 ± 0,29
18.10.	15	19	7,32	5,82	1,29	1,05	5,79 ± 0,36	5,86 ± 0,51
8.11.	16	15	6,07	5,13	1,15	1,03	5,66 ± 0,44	5,44 ± 0,38

QUADRO 2 - Resultados da percentagem de água e dos lípidos totais (mg/g peso fresco e mg/g peso seco) nas amostras de *Mytilus*

Data das colheitas	% ÁGUA		LÍPIDOS TOTAIS (mg/g peso fresco)		LÍPIDOS TOTAIS (mg/g peso seco)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
14.12.82	88,0	84,7	14,9	25,2	123,9	165,6
4.01.83	84,4	83,0	12,7	23,0	81,7	135,5
24.01.	83,9	82,2	14,4	28,5	89,3	159,9
12.02.	83,2	81,6	20,2	26,8	120,5	145,6
7.03.	85,1	84,8	19,8	21,9	132,9	143,9
28.03.	86,0	85,5	9,6	12,7	68,6	87,8
19.04.	87,7	86,9	-	-	-	-
9.05.	87,6	87,1	10,2	11,1	82,0	85,8
30.05.	86,9	85,3	9,0	12,7	69,2	86,4
20.06.	85,9	85,0	7,3	12,4	51,8	82,9
11.07.	86,9	86,4	7,6	8,3	58,4	61,0
1.08.	83,8	82,8	10,4	13,6	64,5	79,0
22.08.	83,1	82,4	9,5	14,3	56,0	81,5
20.09.	84,0	81,1	11,3	21,5	70,6	113,8
18.10.	82,4	81,9	13,3	19,1	75,6	105,7
8.11.	81,0	79,9	13,2	21,5	69,4	106,9

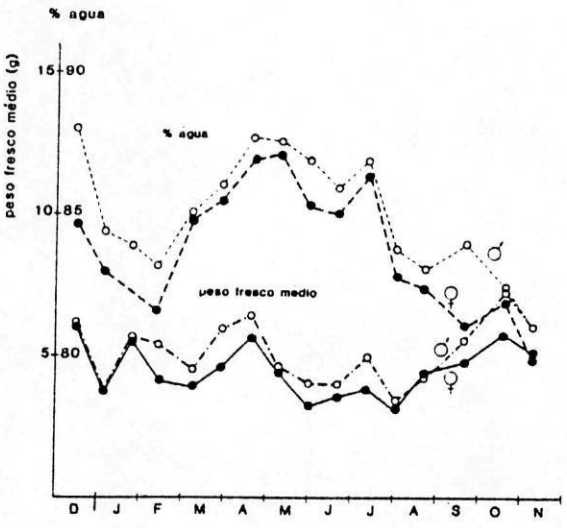


FIG. 3 - Peso fresco médio (g) e % de água medidos nas amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas

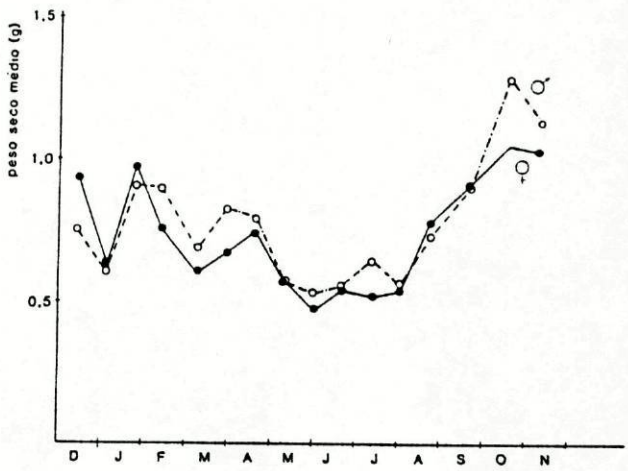


FIG. 4 - Peso seco médio (g) medido nas amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas

O teor em lípidos totais relacionado com o peso fresco e o peso seco (Fig. 5 e 6) apresenta duas fases distintas: uma, de armazenamento e conservação dos lípidos, com início no fim do Verão e estendendo-se até Março seguinte, e a outra, muito constante durante a Primavera e Verão, correspondendo a uma época de posturas parciais e fases de gametogénese, período que corresponde também aos valores mais baixos encontrados por Zandee et al. (1980) no conteúdo em glicogénio e proteínas para *Mytilus* da costa do norte do Atlântico.

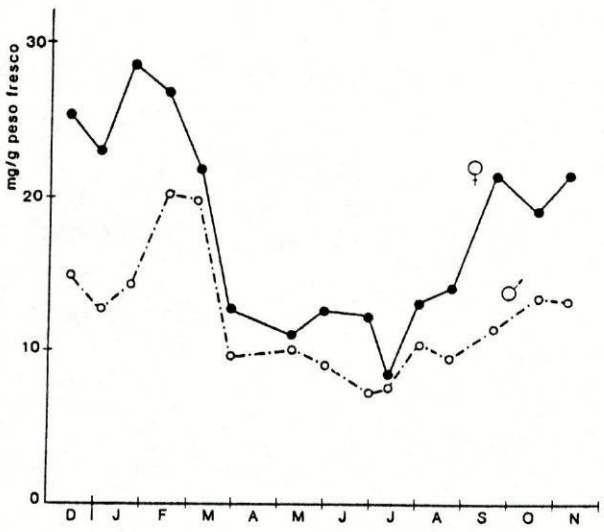


FIG. 5 - Variações sazonais no teor de lípidos totais (mg/g peso fresco), isolados das amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas

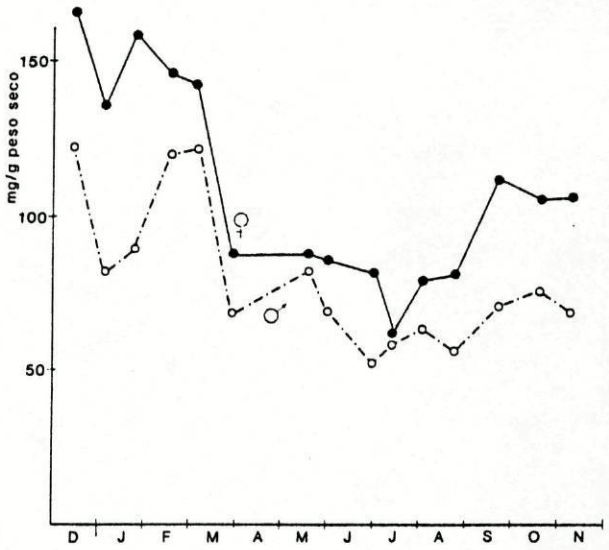
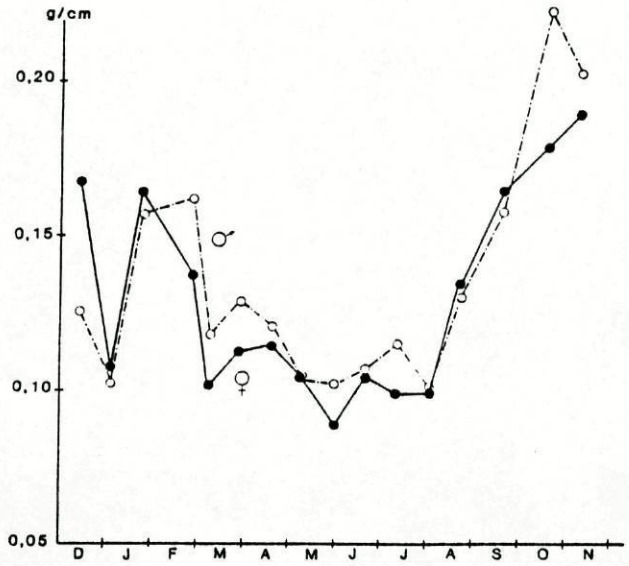


FIG. 6 - Variações sazonais no teor de lípidos totais (mg/g peso seco), isolados das amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas



Na figura 7 determinámos a razão entre o peso seco médio e o comprimento médio da concha para cada amostra (índice de condição), e verificámos pelo gráfico obtido que a fase de maior aumento de peso vai do Verão até Novembro.

FIG. 7 - Crescimento médio dos animais, expresso em função do peso seco e do tamanho da concha

De uma maneira geral poder-se-à dizer que os máximos obtidos correspondem a épocas de maior desenvolvimento das gónadas (como é conhecido, as épocas de maior crescimento linear alternam com estas).

1 - CICLO SEXUAL - INDICE DA GÓNADA

Utilizando a nomenclatura já descrita determinámos para cada sexo o índice médio de maturação da gónada (Quadro 3).

QUADRO 3 - Índice médio de maturação da gónada (± DP) das amostras de *Mytilus*

Data das colheitas	Nº de animais		ÍNDICE MÉDIO DA GÓNADA	
	♂	♀	♂	♀
14.12.82	3	3	3,00 ± 0,00	2,67 ± 0,58
4.01.83	5	5	3,00 ± 0,71	3,00 ± 0,71
25.01.	8	9	2,87 ± 0,64	3,25 ± 0,71
17.02.	8	9	3,75 ± 0,71	3,70 ± 0,71
7.03.	9	9	1,55 ± 0,73	2,56 ± 0,53
28.03.	9	8	1,66 ± 1,00	2,62 ± 0,92
19.04.	8	9	1,63 ± 0,74	2,44 ± 0,53
9.05.	8	8	1,63 ± 0,92	2,50 ± 0,76
30.05.	7	11	2,00 ± 0,82	2,22 ± 0,83
29.06.	8	7	1,75 ± 1,39	2,29 ± 1,25
11.07.	9	9	1,11 ± 0,93	1,78 ± 0,83
1.08.	8	8	1,71 ± 1,38	0,22 ± 0,66
22.08.	8	9	2,63 ± 1,19	2,44 ± 0,53
20.09.	9	9	3,78 ± 0,44	3,88 ± 0,35
18.10.	8	10	3,50 ± 0,53	2,75 ± 0,89
8.11.	5	10	3,20 ± 0,84	2,40 ± 0,97

Foram observados, de Dezembro de 1982 a Novembro de 1983, 120 machos e 130 fêmeas, distribuídos por 16 colheitas.

Faremos de seguida uma descrição resumida do aspecto microscópico dos cortes histológicos observados e da sua distribuição pelas oito fases.

1982

DEZEMBRO - Nos machos cerca de 60% dos animais estudados estavam parasitados, os restantes na fase de desenvolvimento d_3 (Fig. 14). As espermatogónias e os espermatócitos formavam uma banda de células com alguma profundidade, e os espermatozóides enchiam quase por completo o lúmen do folículo. Os folículos não eram ainda confluentes.

As fêmeas foram classificadas nas fases de desenvolvimento d_2 e d_3 (Fig. 27 e 29). A primeira caracterizada pela presença de oócitos jovens, com um núcleo finamente reticulado e bastante enraizados na parede do folículo. Na fase d_3 apareciam já muitos oócitos completamente maduros, a par de oócitos ainda em vitelogénese que apresentavam um contorno poligonal e estavam ligados à parede do folículo por um pedúnculo.

1983

JANEIRO - Machos na fase d_3 (60%) e um na fase d_2 com um maior número de espermatogónias, células primárias de desenvolvimento com um núcleo grande e cromatina dispersa em aglomerados finos, e espermatócitos I e II orientados centripetamente, assim como espermatozóides, estes ainda em pequeno número. Detectámos também em alguns animais (20%) uma emissão parcial de gâmetas, isto é, uma desorganização no arranjo lamelar dos espermatozóides. Verificou-se também uma redução na área do manto ocupada pelo tecido genital.

As fêmeas apresentavam as fases d_2 (20%), d_3 (60%) e d_4 (20%), com oócitos em vitelogénese e outros já completamente desenvolvidos (Fig. 46). Durante esta fase de crescimento continuaram a formar-se nas zonas distais do manto oócitos jovens por multiplicação das oogónias. Na fase de maturação máxima, d_4, os oócitos apresentavam-se imbricados uns nos outros, por vezes com uma aparência poligonal.

- No fim do mês de Janeiro os machos fixados encontravam-se na fase d_3 (50%) e só um na fase d_4 (12,5%) com os folículos cheios de espermatozóides ordenados em lamelas. As

fêmeas encontravam-se todas na fase d_4.

FEVEREIRO - A maior parte dos machos foram classificados no estado d_4 (Fig. 17) (87,5%), podendo ver-se em alguns animais uma mancha de espermatozóides com o consequente desarranjo lamelar, indício de que a emissão de gâmetas estava prestes a dar-se. Apenas um animal se apresentava num estado inicial de desenvolvimento d_2.

Também a maioria das fêmeas estava no máximo de desenvolvimento sexual d_4 (Fig. 34) (80%), e só uma se apresentava na fase d_2 com o manto com pequeno número de folículos, com grande número de oogónias e oócitos jovens.

MARÇO - A amostra referente aos machos apresentava uma certa heterogeneidade. Encontraram-se animais nas fases d_1, d_2 e d_3 de reconstituição da gónada, bem como fases de emissão de gâmetas s_1 (Fig. 19) (40%). O tecido conjuntivo de reserva era aqui muito reduzido apresentando algumas células vesiculosas, estando as células adipogranulosas praticamente ausentes. Nas fêmeas, a par das fases d_2 (10%) e d_3 (45%), detectámos as fases de postura s_3 (Fig. 37) e s_2 (35%) onde pudemos observar a passagem de oócitos para os canais vectores e, no mesmo animal, a presença de folículos em maturação com células jovens ligadas à parede do folículo.

- No fim do mês de Março os machos continuavam a emitir gâmetas encontrando-se uma percentagem elevada de folículos vazios de espermatozóides, mas com uma banda de células de desenvolvimento. O tecido conjuntivo continuava pouco desenvolvido.

Nas fêmeas apareceram em simultâneo fases de desenvolvimento e de desova.

ABRIL - Predominância dos machos nas fases d_1 (Fig. 10) e d_2. O tecido conjuntivo era um pouco mais abundante. Encontrámos alguns animais com folículos só com espermatogónias e espermatócitos enchendo por completo o lúmen.

Nas fêmeas continuou a fase de desova e recuperação com uma fase de gametogénese muito rápida.

MAIO - Machos em fase de recuperação da gónada, embora alguns exemplares os folículos praticamente vazios de espermatozóides e sem a presença de células primárias de desenvolvimento, classificados de s_1 (37,5%). Tecido conjuntivo pouco abundante.

As fêmeas apresentavam-se sobretudo nas fases d_2 (Fig. 25) e d_3 (Fig. 30) (62,5%), já com uma área significativa do manto ocupada pelo tecido conjuntivo de reserva, com folículos, por vezes em pequeno número, cheio de oogónias e oócitos em pré-vitelogénese.

- No fim do mês de Maio os machos estavam nas fases d_2 e d_3 e só um exemplar na fase s_1.

JUNHO - Nos machos os folículos continuavam em recuperação com um maior número de animais em fase mais avançada de gametogénese (30%). Continuava também a emissão de gâmetas, não sendo possível em dois animais determinar o sexo, sendo assim classificados em **0** (Fig. 9).

Nas fêmeas a área ocupada pelo tecido genital era pequena. Pudemos detectar uma fêmea em que a emissão dos gâmetas tinha sido quase total, e sem células primárias de desenvolvimento.

JULHO - Nos machos as fases de desenvolvimento confundiam-se em alguns exemplares com as fases de emissão de gâmetas. O tecido conjuntivo de reserva foi aqui mais evidente e 20% dos animais foram classificados na fase de repouso sexual **0**.

Fêmeas com predominância de animais em fase de emissão de gâmetas, s_2 (Fig. 39) (40%) e s_1 (10%), com alguns folículos completamente vazios.

AGOSTO - Nos machos continuou a emissão de gâmetas, podendo localizar-se espermatozóides nos canais vectores ciliados (Fig. 20). No centro de alguns folículos notava-se a presença de um aglomerado de material resultante da lise dos gâmetas residuais. Podia ainda ver-se a presença de aglomerados de células amoebóides no interior do folículo, e no tecido

conjuntivo circundante.

Nas fêmeas os folículos estavam vazios, só se reconhecendo o sexo pela presença esporádica de alguns oócitos (Fig. 43). Foi também a época de maior emissão de gâmetas. Presença de células fagocitárias (amoebócitos) dentro de folículos, lisando os gâmetas.

- No fim do mês de Agosto notou-se uma recuperação rápida da gónada, com praticamente todos os animais na fase d_3 (62,5%) e grande abundância de células adipogranulosas.

As fêmeas, também numa fase muito rápida de recuperação, com animais em d_2 (45%) e d_3 (40%). Em alguns especímenes a área do manto ocupada pelo tecido reprodutivo era ainda pequena, mas com folículos onde existiam já oogónias e oócitos em vitelogénese.

SETEMBRO - Machos sexualmente maduros classificados na fase d_4 (80%), podendo ver-se uma banda estreita de células primárias e o lúmen completamente ocupado por espermatozóides.

Nas fêmeas também encontrámos a grande maioria na fase d_4 (80%), com folículos com grande predominância de oócitos maduros. Presença de tecido conjuntivo de reserva interfolicular.

OUTUBRO - Animais em fase de desenvolvimento d_3 (50%) e d_4 (50%). No tecido conjuntivo interfolicular encontravam-se células largas, vacuoladas, adipogranulosas. Em alguns animais a área do manto ocupada pelos folículos era pequena, embora estes tivessem o aspecto de folículos maduros. Outros animais mostravam que tinha havido uma ligeira emissão de gâmetas, caracterizada pelo desarranjo das lamelas de espermatozóides, e movimento de esperma para os canais vectores.

Fêmeas em fase de desenvolvimento igualmente repartido pelas três fases, e com grande abundância de tecido conjuntivo de reserva.

NOVEMBRO - Encontrámos machos sexualmente maduros (40%) e animais nas fases s_3 (40%) e s_2 (20%), em que metade ou mais dos gâme-

tas tinham sido emitidos e ao mesmo tempo com alguns folículos em fase de recuperação com uma banda periférica de espermatogónias e espermatócitos.

As fêmeas classificámo-las nas fases de desenvolvimento com predominância para a d_3 (40%) e d_2 (30%).

A figura 8 representa graficamente os índices de maturação das gónadas, obtidos a partir da observação dos cortes histológicos dos mantos dos machos e das fêmeas.

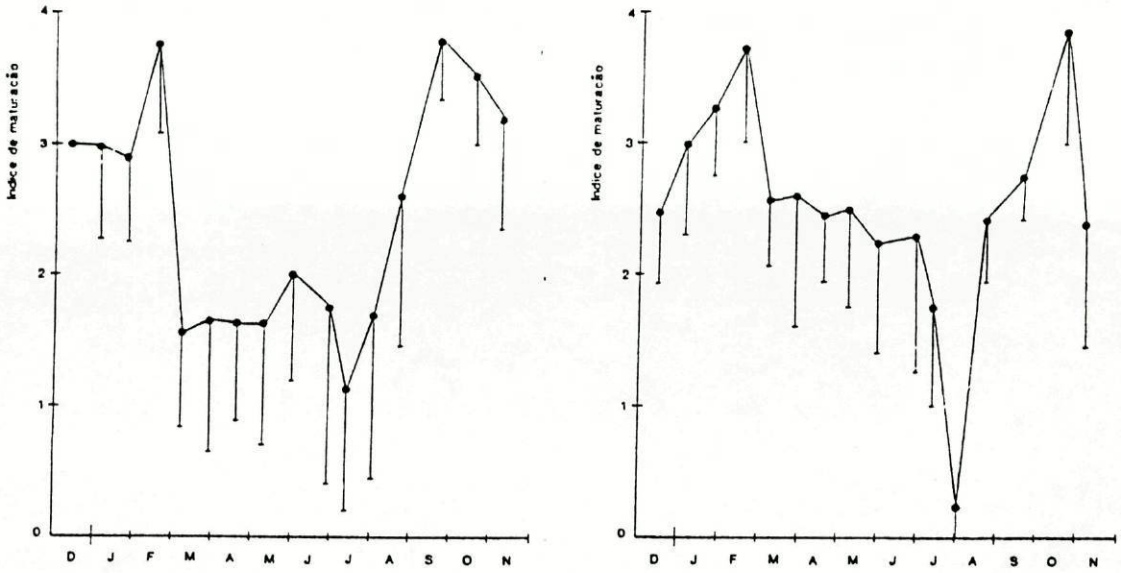


FIG. 8 - Índice médio de maturação das gónadas de *Mytilus*, machos e fêmeas, das colheitas efectuadas de Dezembro de 1982 a Novembro de 1983

Analisando os gráficos da figura 8 verificamos que para ambos os sexos o período de gametogénese se prolonga do Outono até ao fim do Inverno, atingindo as gónadas o desenvolvimento máximo no mês de Fevereiro. Entre os meses de Março e Julho verifica-se uma certa homogeneidade nos valores encontrados para os índices, embora mais baixos que os anteriores, porque o aparecimento de fases de postura parcial logo foi seguido de uma fase de desenvolvimento rápido, sendo contudo os desvios calculados os mais elevados, indicativos de um certo desfazamento entre os animais.

Mas a época de emissão dos gâmetas mais intensa foi nos meses de Julho/Agosto, para ambos os sexos, tendo-se verificado para as fêmeas da colheita de princípios de Agosto cerca de 90% de animais com as gónadas completamente vazias. Seguiu-se uma época de gametogénese muito intensa, favorecida pelas temperaturas elevadas da água do mar e pela abundância de alimentos (fitoplâncton) características deste período do ano, permitindo aos animais atingirem um novo máximo de maturação nos princípios de Outubro.

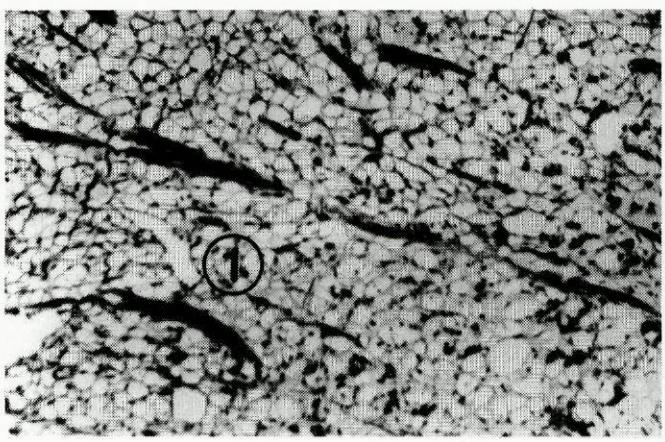


FIG. 9 - Fase de repouso sexual 0. 1-tecido conjuntivo de reserva que ocupa todo o tecido genital (×25)

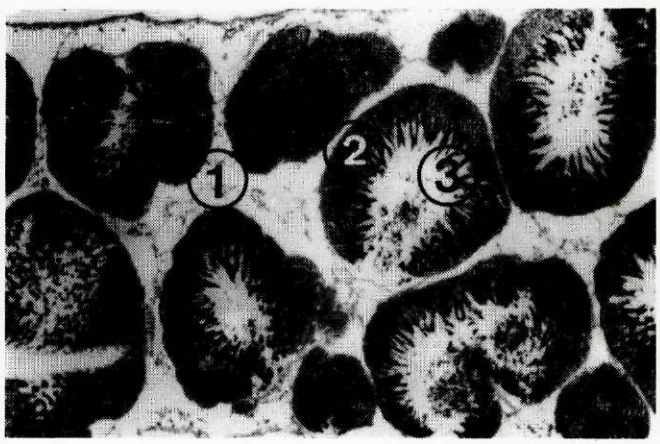


FIG. 10 - Fase de desenvolvimento d_1. 1-tecido conjuntivo; 2-banda centrípeta de células de desenvolvimento, espermatogónias, espermatócitos e espermatídeos; 3-espermatozóides (×25)

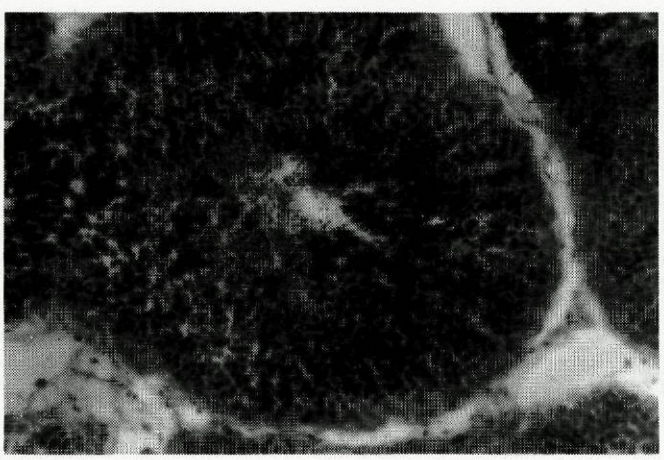


FIG. 11 - Detalhe ampliado da figura anterior (×100)

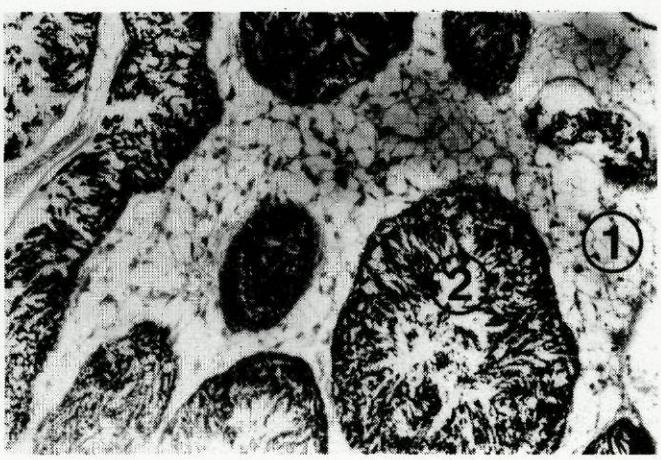


FIG. 12 - Fase de desenvolvimento d_2. 1-tecido conjuntivo de reserva; 2-começo de organização dos espermatozóides em trabéculas (×25)

FIG. 13 - Fase de desenvolvimento d_2 (×25)

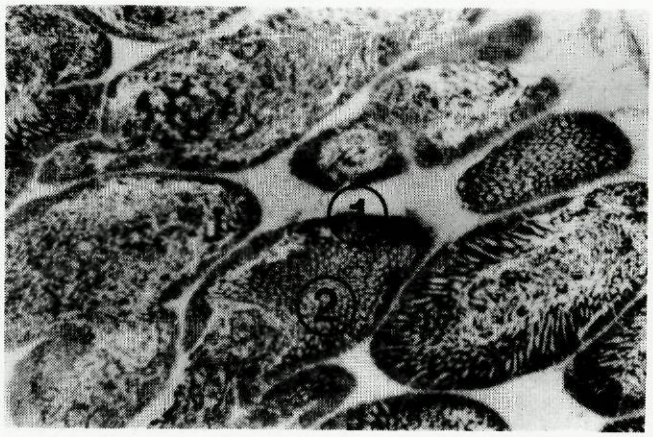


FIG. 14 - Fase de desenvolvimento d_3. 1-banda de células primárias de desenvolvimento; 2-trabéculas de espermatozóides (×25)

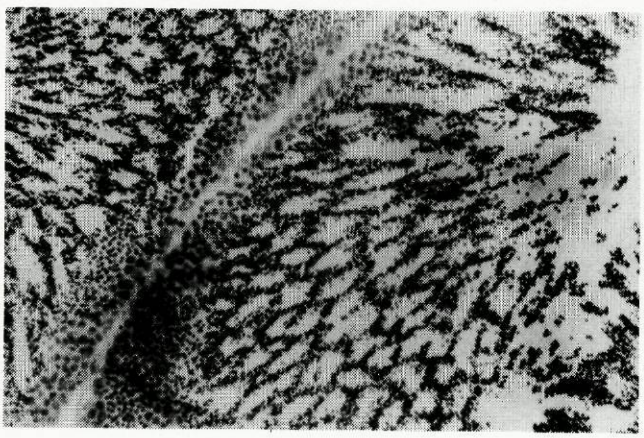


FIG. 15 - Aspecto da disposição dos espermatozóides em dois folículos na fase de desenvolvimento d_3 (×100)

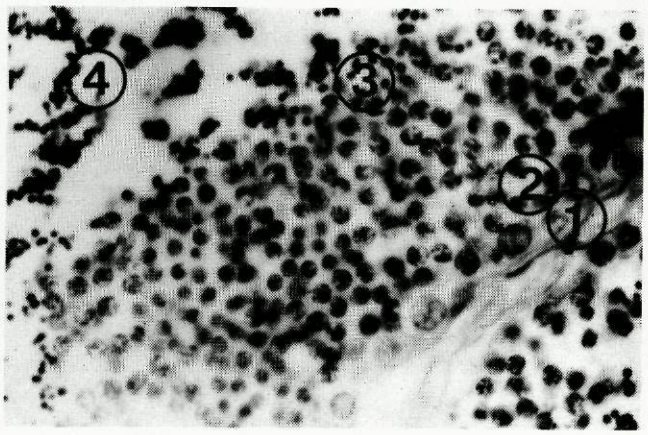


FIG. 16 - Detalhe ampliado da figura anterior. 1-espermatogónias; 2-espermatócitos; 3-espermatídeos; 4-espermatozóides (×250)

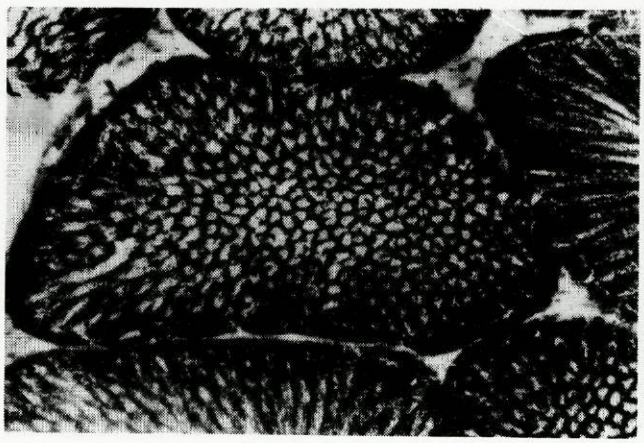


FIG. 17 - Fim da espermatogénese, fase d_4. Redução do tecido conjuntivo de reserva. O animal está prestes a ejacular (×50)

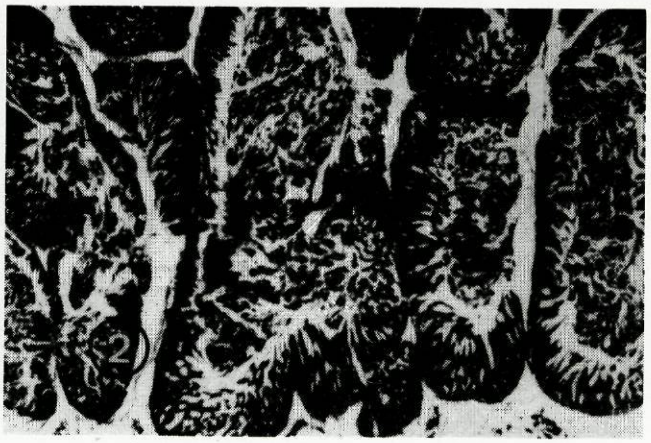


FIG. 18 - Fase de emissão de gâmetas s_3. 1-mancha de espermatozóides no lúmen do folículo 2-desorganização das trabéculas (×25)

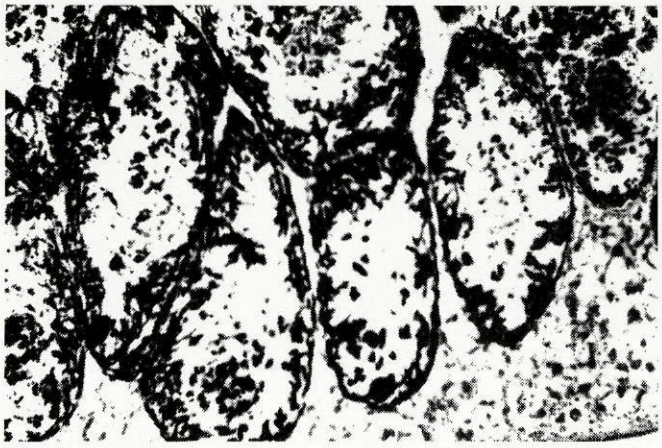


FIG. 19 - Fase s_2/s_1 da emissão de gâmetas. Folículos muito vazios (×25)

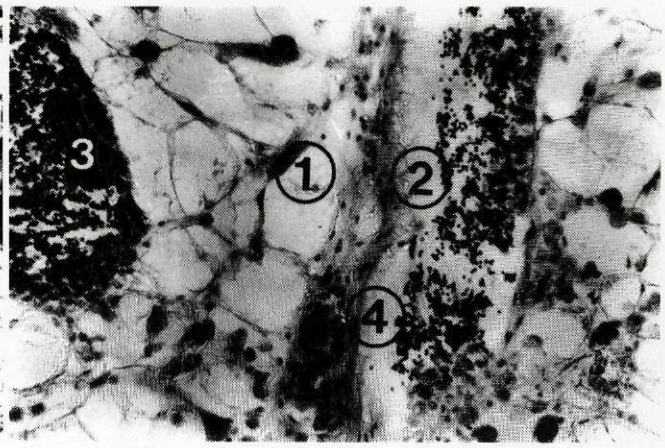


FIG. 20 - Detalhe de uma fase de emissão de espermatozóides e recuperação. **1**-célula adipogranulosa; **2**-canal vector com espermatozóides; **3**-folículo; **4**-células ciliadas da parede do canal vector (×100)

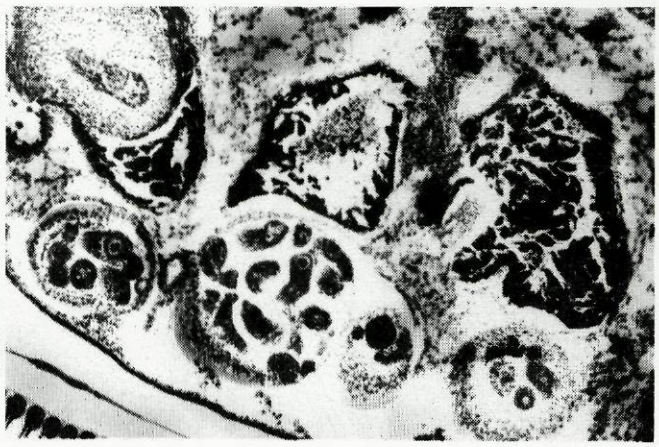


FIG. 21 e 22 - Aspectos da gónada de um macho parasitado. Verifica-se que as células desaparecem de dentro dos folículos que passam a estar ocupados por esporocistos de *Protoeces maculatus* (×25)

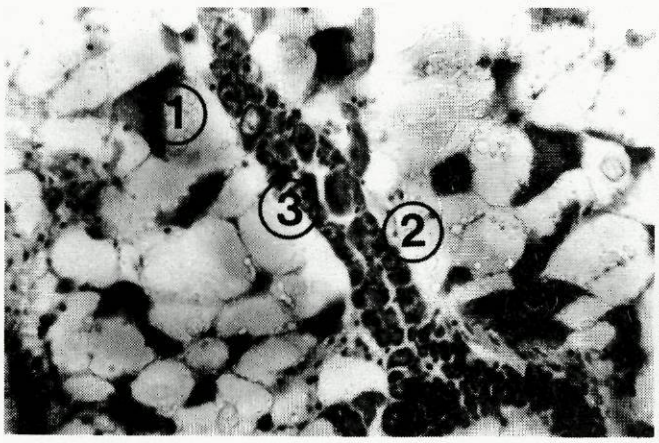


FIG. 23 - Fase de desenvolvimento d_1 com tecido conjuntivo abundante. **1**-célula adipogranulosa; **2**-oogónias; **3**-oócito em pré-vitelogénese (×50)

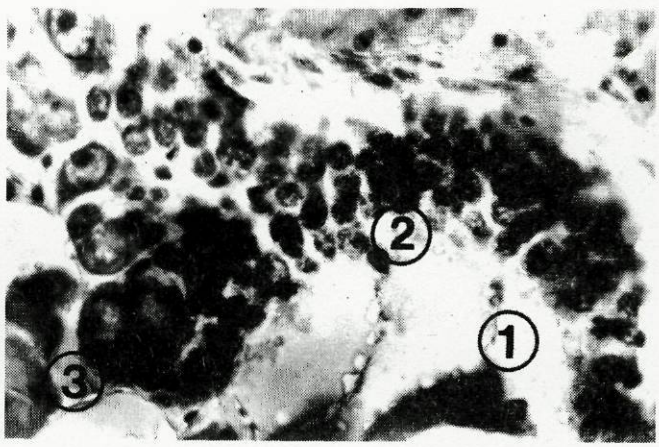


FIG. 24 - Detalhe ampliado da figura anterior com a mesma legenda (×100)

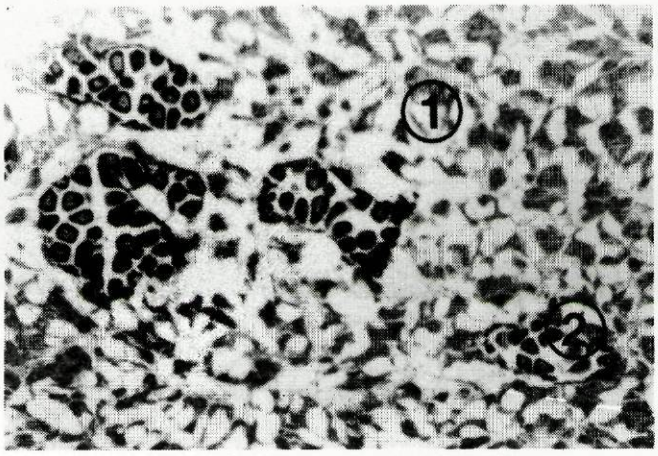


FIG. 25 - Fase de desenvolvimento d_2. 1-tecido conjuntivo de reserva; 2-folículos em crescimento (×25)

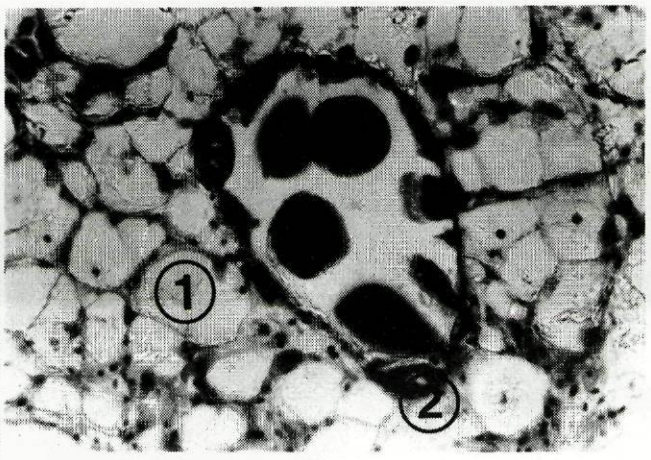


FIG. 26 - Folículo da fase d_2. 1-célula do tecido conjuntivo (célula de Leydig); 2-oócito em pré-vitelogénese (×100)

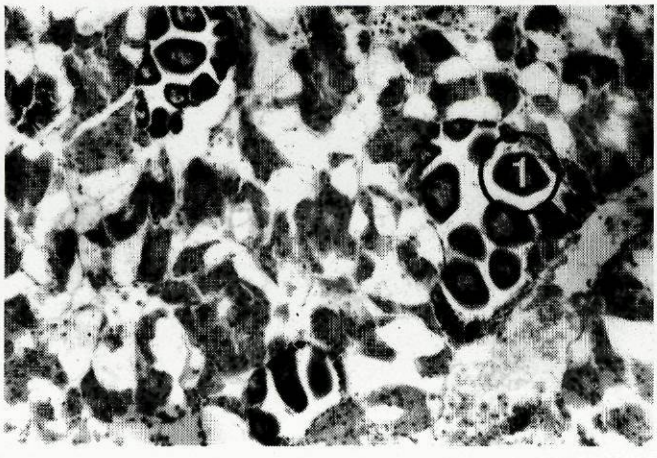


FIG. 27 - Outro aspecto da fase de desenvolvimento d_2. 1--oócitos já desenvolvidos (×50)

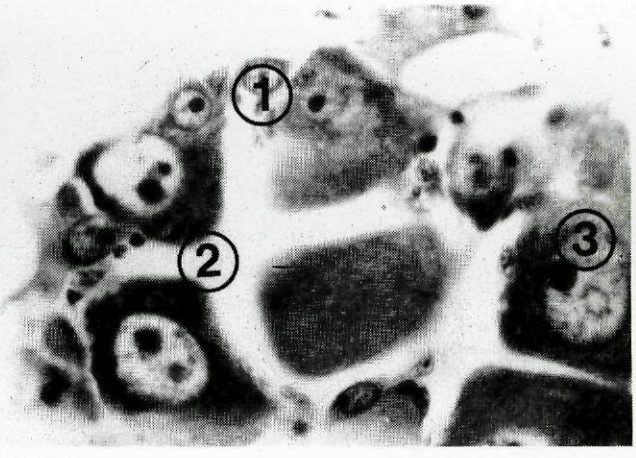


FIG. 28 - Ampliação de um folículo da fase d_2. 1-oogónia; 2--oócitos ligados à parede do folículo em pré-vitelogénese; 3-nucléolo (×250)

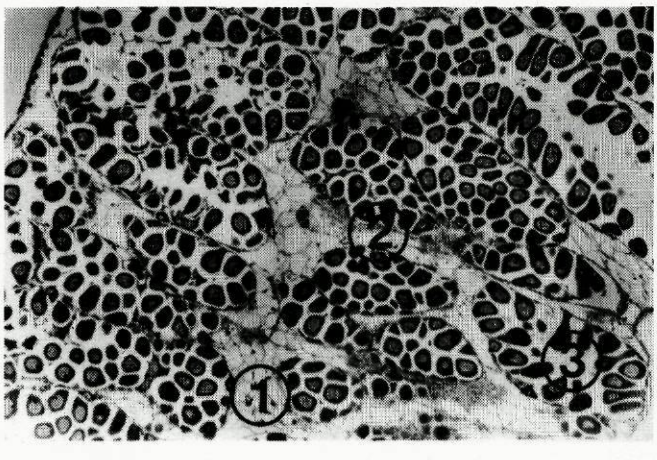


FIG. 29 - Fase de desenvolvimento d_3. 1-tecido conjuntivo de reserva; 2-folículos; 3--oócitos (×25)

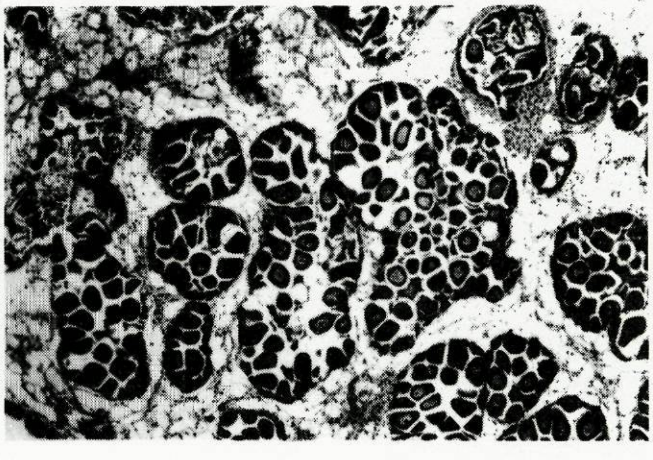


FIG. 30 - Fase de desenvolvimento d_3 com tecido conjuntivo interfolicular abundante (×25)

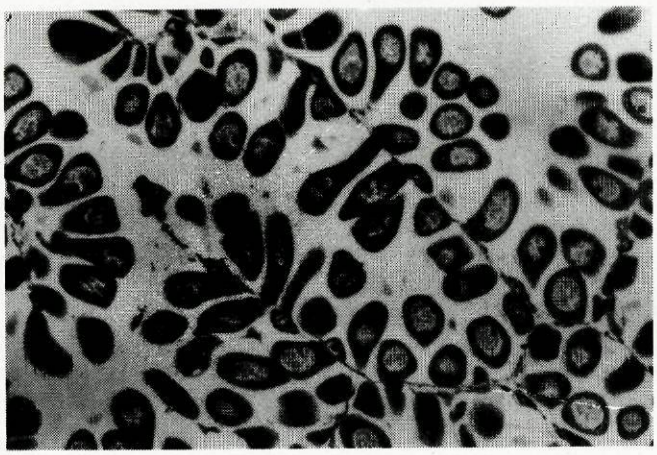


FIG. 31 - Fase de desenvolvimento d_4. 1-Folículos com oócitos de aspecto poligonal enraizados na parede do folículo (×50)

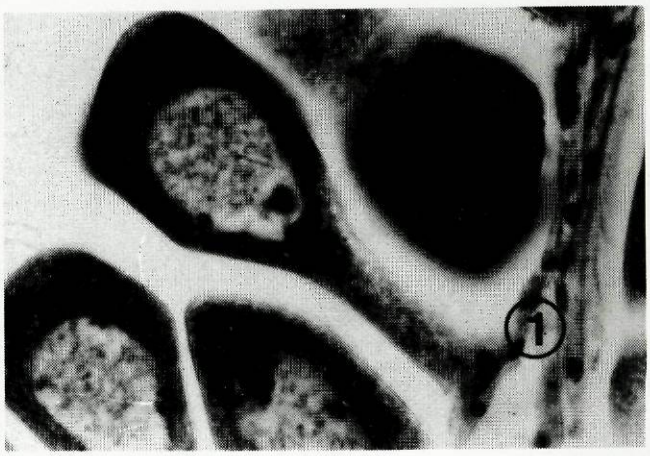


FIG. 32 - Aspecto ampliado de oócitos poligonais. 1-parede do folículo (×250)

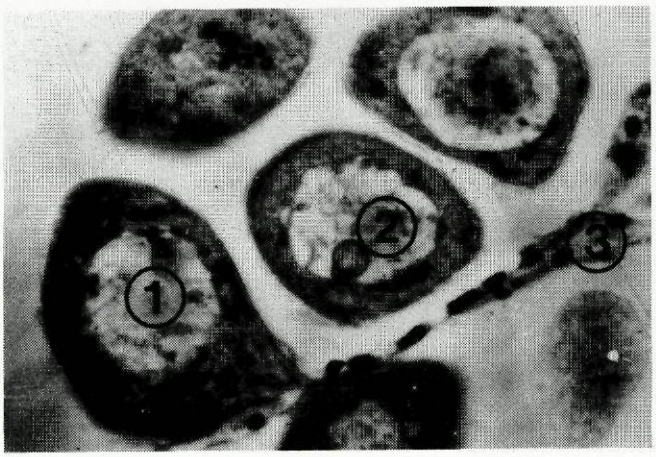


FIG. 33 - Oócitos que terminaram o seu desenvolvimento. 1--núcleo com aglomerados de cromatina; 2-nucléolo volumoso; 3--canal sanguíneo (×250)

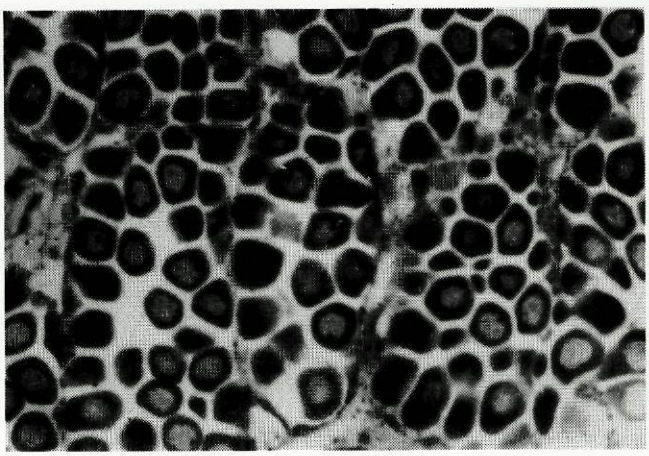


FIG. 34 - Gónada na fase de desenvolvimento máximo d_4. Folículos confluentes (×50)

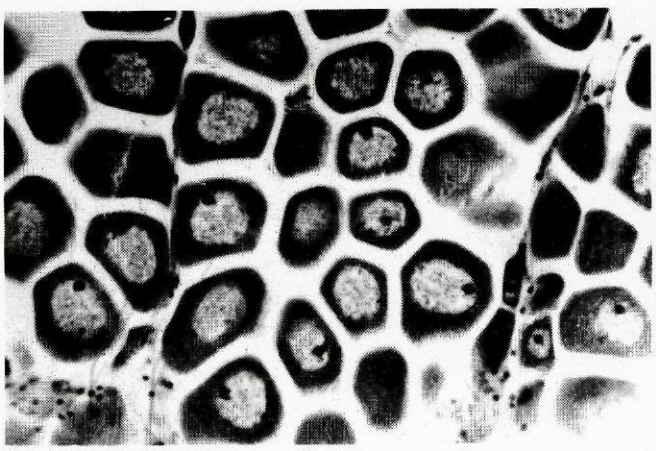


FIG. 35 - Fase de desenvolvimento d_4. Preponderância de oócitos maduros dentro dos folículos (×100)

FIG. 36 - Detalhe de um folículo com oócitos completamente maduros (×250)

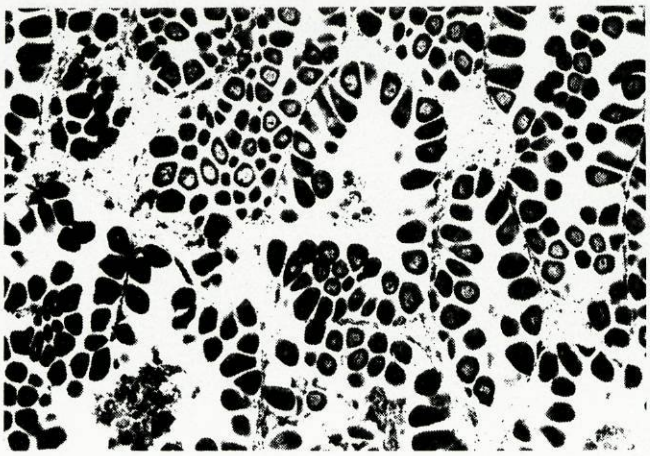


FIG. 37 - Fase inicial da postura s_3 (×25)

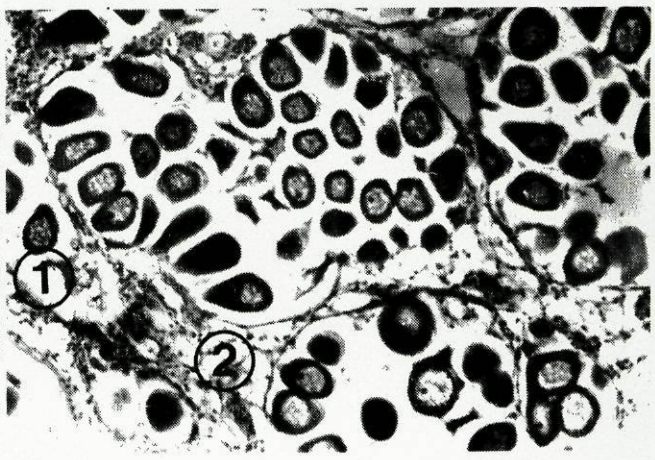


FIG. 38 - Folículos em que se começou a dar a emissão de gâmetas. 1-canal vector; 2-tecido interfolicular (×50)

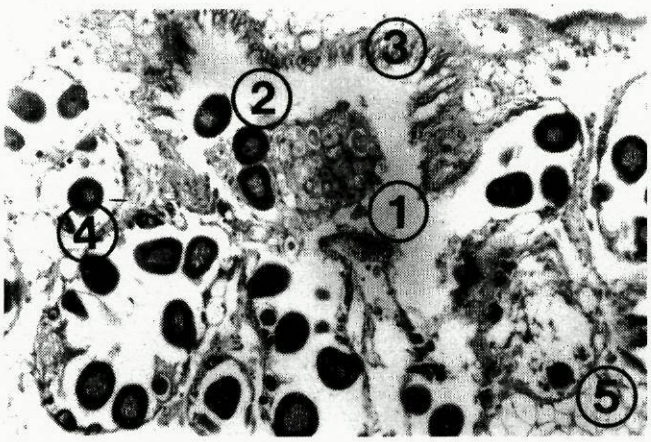


FIG. 39 - Fase mais avançada da postura s_2/s_1. 1-canal vector; 2-amibócitos que irão lisar os gâmetas nao emitidos; 3-epitélio ciliado da parede do canal vector; 4- folículo com oócitos em redesenvolvimento; 5-tecido conjuntivo de reserva (×50)

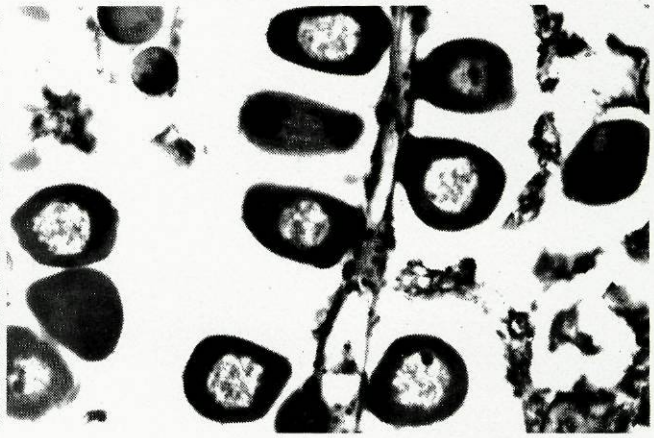


FIG. 40 - Aspecto de dois folículos parcialmente vazios com restos de material resultante da decomposição de alguns oócitos (×100)

FIG. 41 - Folículo em comunicação com um canal vector (×50)

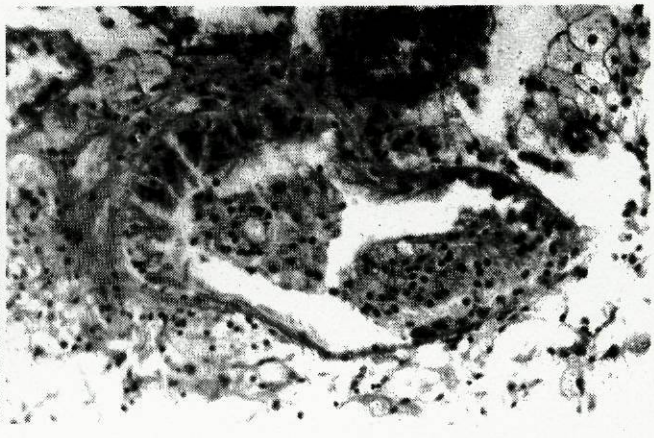


FIG. 42 - Canal vector com o lúmen cheio de células líticas (×100)

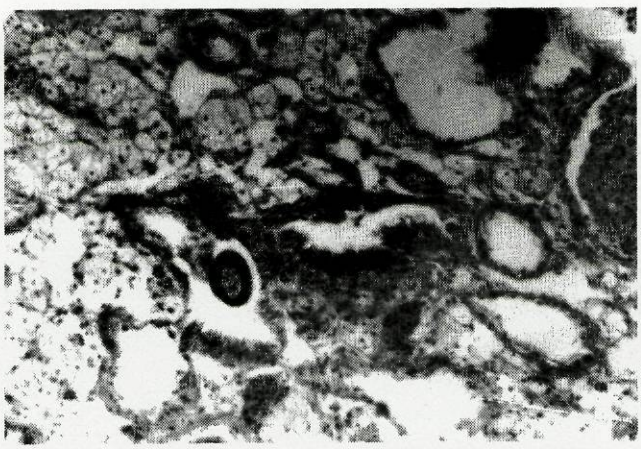


FIG. 43 - Fase final da postura Nota-se a presença de um oócito dentro de um canal vector e muitos outros folículos vazios (×50)

FIG. 44 - Após a postura começa a fase de recuperação da gónada Nota-se a presença de folículos com oócitos em fase de crescimento (×100)

FIG. 45 - Folículo em redesenvolvimento (×250)

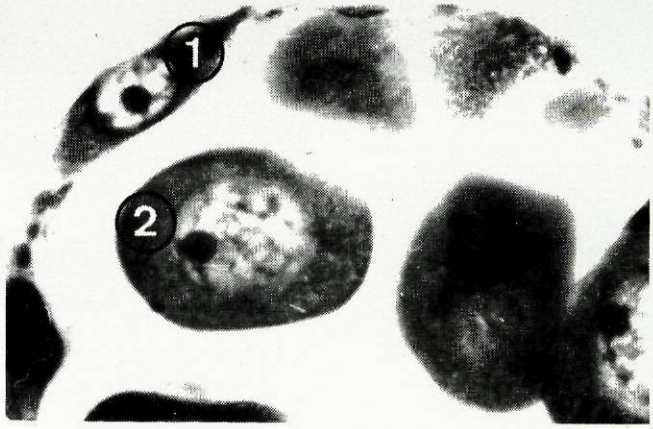


FIG. 46 - Aspecto de oócitos em dois estados de maturação. 1--oócito em pré-vitelogenese; 2--oócito em vitelogénese (×250)

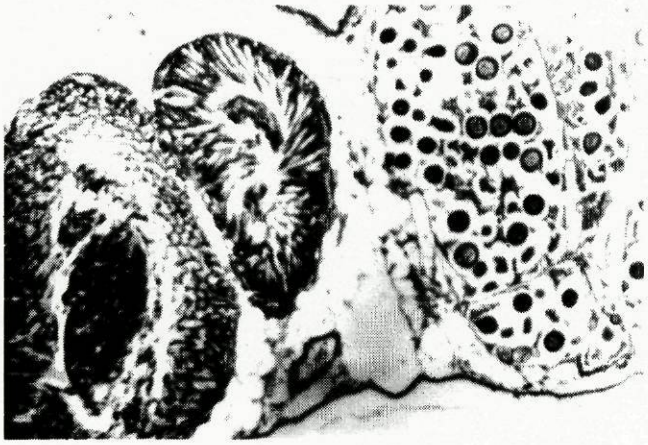


FIG. 47 - A gónada de um mexilhão hermafrodita com metade da área do manto ocupada por folículos masculinos e a outra metade por folículos femininos, ambos na mesma fase de postura-s_3 (×50)

No estudo histológico dos animais (cerca de 150) só foi encontrado um espécimen hermafrodita (Fig. 47).

A ocorrência de hermafroditismo ocasional já tinha sido descrita por autores como Sugiura (1962) e Seed (1969).

Na nossa amostra, como se pode verificar pela figura 47, metade do manto fixado pertencia ao sexo masculino e a outra metade ao sexo feminino, ambos igualmente desenvolvidos e classificados na fase s_3.

Em 1982 Kautsky, num estudo feito no Mar Báltico, encontrou também um exemplar, mas em que metade do corpo era do sexo masculino e a outra metade do sexo feminino, ambas no mesmo estado de desenvolvimento.

2 - CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC) CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO (GLC)

Os extractos dos lípidos totais depois de "deslipidificados" foram passados pela coluna troca-iónica, dando origem a duas fracções: a metanólica e a metanólica a 80%, que foram primeiro separadas nos seus componentes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

As figuras 48, 49, 50 e 51 representam alguns dos cromatogramas obtidos, quer para os padrões quer para as fracções metanólicas.

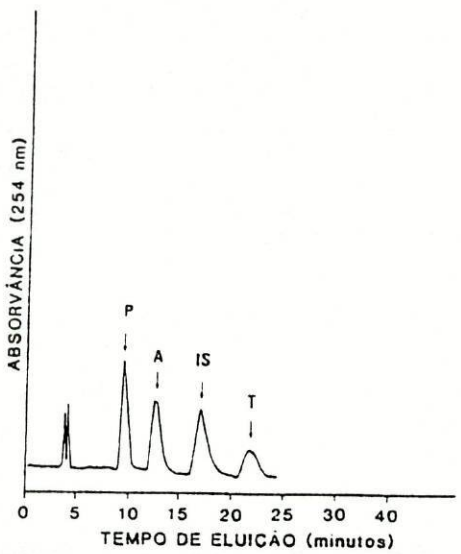


FIG. 48 - Cromatograma da mistura de esteróides após separação por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). P--progesterona; A-androstenedione; IS-padrão interno; T-testosterona. Coluna Micropack Si--10 (30cm × 4mm DI). Fase móvel diclorometano-acetato de etilo-isopropanol (93:6:1)

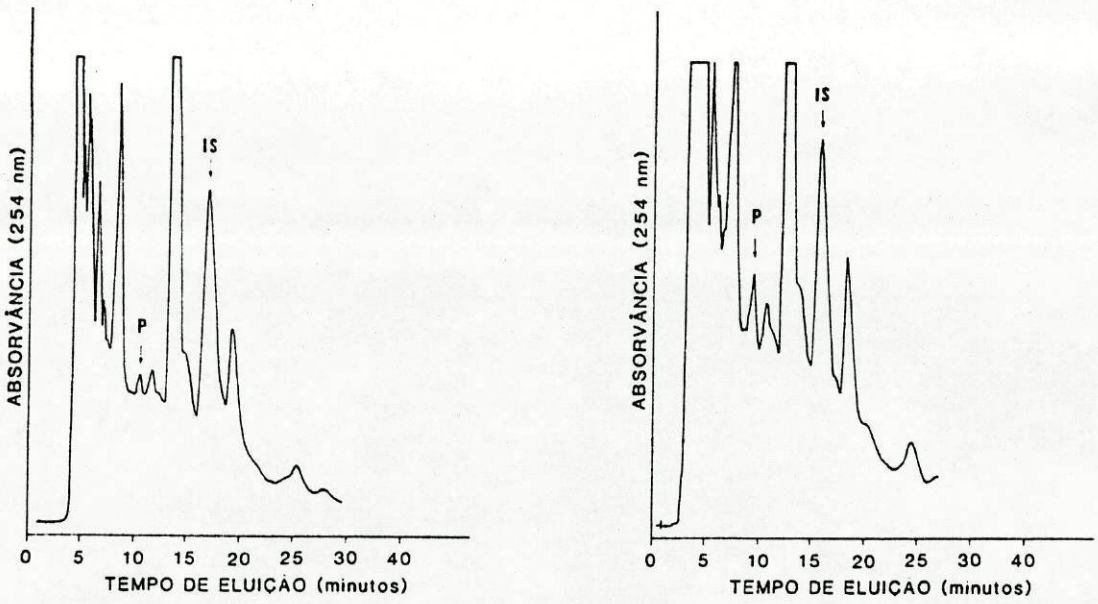


FIG. 49 - Cromatogramas dos esteróides, após separação por HPLC, das fracções metanólicas de *Mytilus*, machos e fêmeas, da colheita de 29.06.83. **P**-progesterona; **IS**-padrão interno

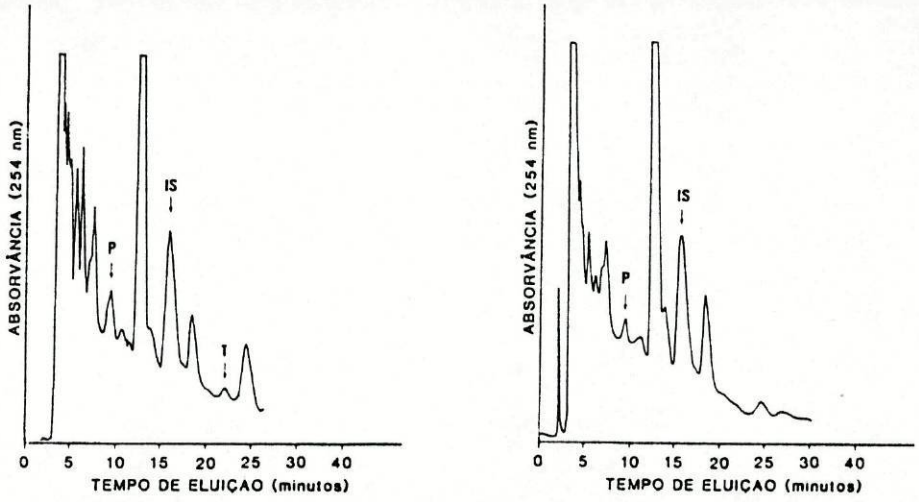


FIG. 50 - Cromatogramas dos esteróides, após separação por HPLC, das fracções metanólicas de *Mytilus*, machos e fêmeas, da colheita de 11.07.83. **P**-progesterona; **IS**-padrão interno; **T**-testosterona

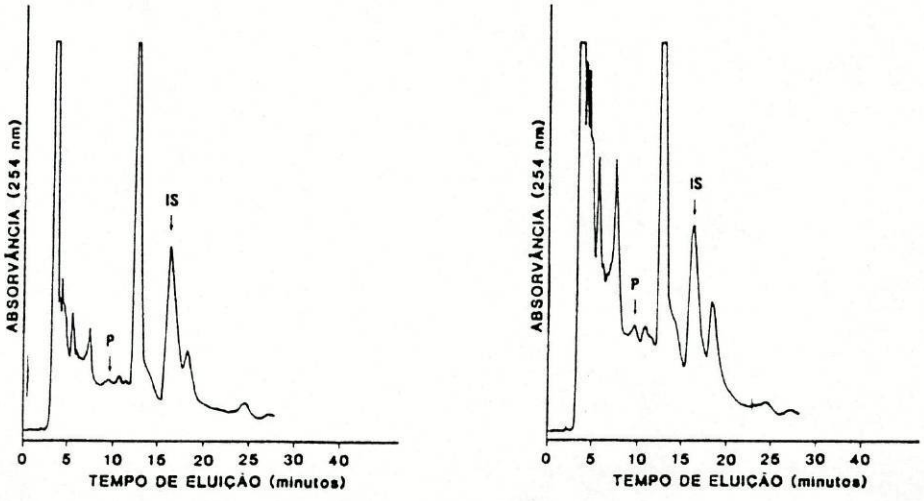


FIG. 51 - Cromatogramas dos esteróides, após separação por HPLC, das fracções metanólicas de *Mytilus*, machos e fêmeas, da colheita de 20.08.83. **P**-progesterona; **IS**-padrão interno

A separação da mistura dos padrões, **P** - progesterona, **A** - androstenediona, **IS** - padrão interno, **T** - testosterona, foi conseguida nas condições já descritas anteriormente, dentro de um intervalo de tempo curto (25 min). Os factores de resolução R_s variaram entre 1 e 1,3 e foram calculados pela fórmula seguinte:

$$R_s = \frac{d_2 - d_1}{2\,(\sigma_1 + \sigma_2)}$$

em que:

d_2 e d_1 - são as distâncias entre dois picos

σ_1 e σ_2 - são as espessuras dos dois picos medidos a meia altura

Se a separação e identificação da progesterona não ofereceu dificuldades de maior, a identificação da androstenediona, com um tempo de eluição de 9 min, foi sempre impedida pela presença de um pico referente a um outro composto que se encontrava em quantidade muito superior.

A separação e quantificação da testosterona não foram tão fáceis como as da progesterona, devido a dois factores fundamentais: primeiro, porque a concentração em que se encontrava nas amostras era muito inferior à da progesterona, e segundo, porque devido à polaridade da fase estacionária da coluna (sílica) a testosterona ligava-se fortemente aos radicais polares, resistindo à competição exercida pelo solvente para esses radicais, sendo portanto dificilmente arrastada, como se pode ver nos cromatogramas da figura 52.

Com a mesma coluna fizemos a separação dos estrogénios da fracção metanólica a 80% (Fig. 53). Também para os padrões, E_1-estrona, E_2--estradiol, IS-padrão interno, foram calculados pela mesma fórmula os factores de resolução, obtendo-se valores de 2,0 e 1,07.

Na figura 54 podemos observar nos dois cromatogramas um pico com o mesmo tempo de eluição do estradiol, cerca de 12 min, e que provavelmente corresponderá a uma fracção que conterá este esteróide.

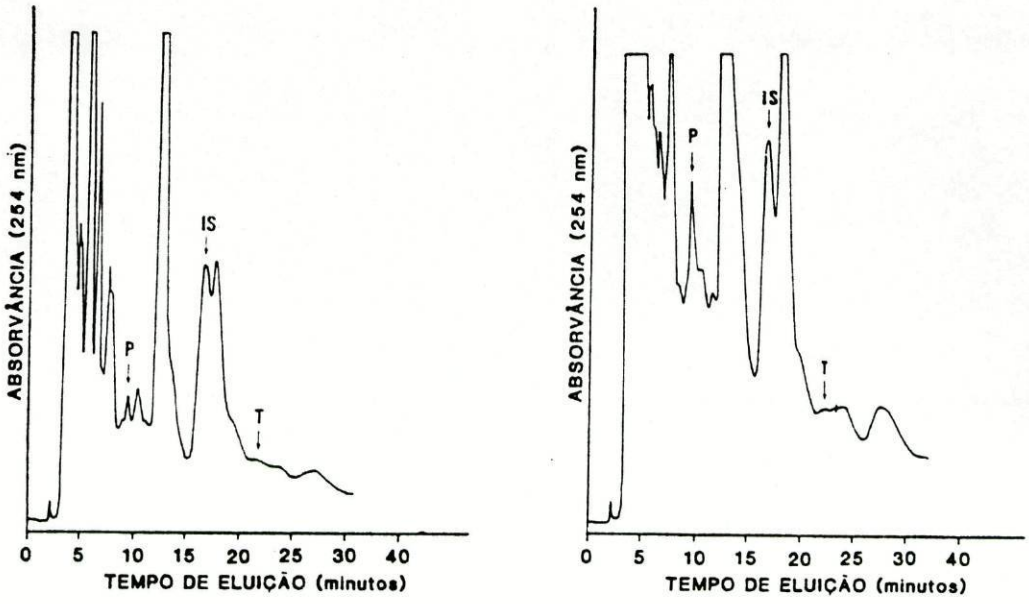


FIG. 52 - Cromatogramas dos esteróides, após separação por HPLC, das fracções metanólicas de *Mytilus*, machos, das colheitas de 18.10 e 8.11 de 1983. **P**-progesterona; **IS**-padrão interno; **T**-testosterona

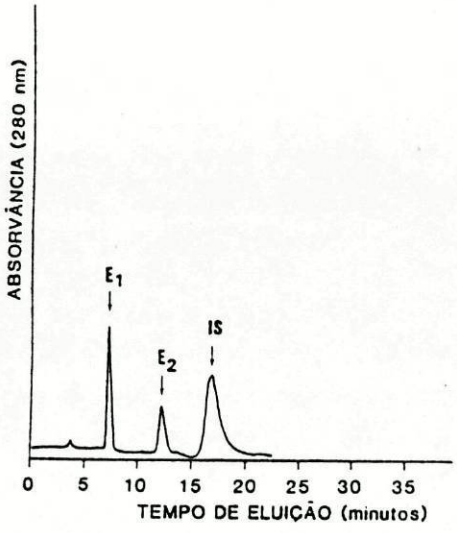


FIG. 53 - Cromatograma da mistura de esteróides, após separação por HPLC. E_1-estrona; E_2-estradiol; IS-padrão interno. Coluna Micropack Si-10 (30cm × 4mm DI). Fase móvel n-hexano-isopropanol (99,9:0,1)

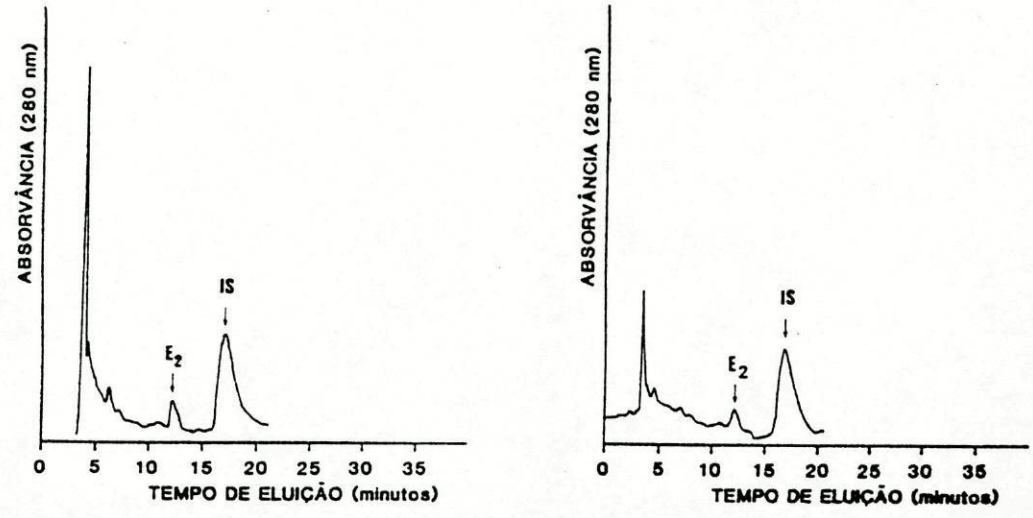


FIG. 54 - Cromatogramas dos esteróides, após separação por HPLC, das fracções metanólicas aquosas (80 %) de *Mytilus*, machos e fêmeas, da colheita de 9.05.83. E_2-estradiol; IS-padrão interno

Na figura 55 as quantidades detectadas para o estradiol são muito mais baixas, e na fracção correspondente às fêmeas o pico é ocultado pelo de um outro composto que se encontrava em concentração muito maior.

Nos cromatogramas da figura 56 foi detectada a presença da estrona e do estradiol, em machos e fêmeas, em quantidades muito semelhantes.

As fracções recolhidas em HPLC foram cada uma delas injectadas em Cromatografia Gás-Líquido (GLC).

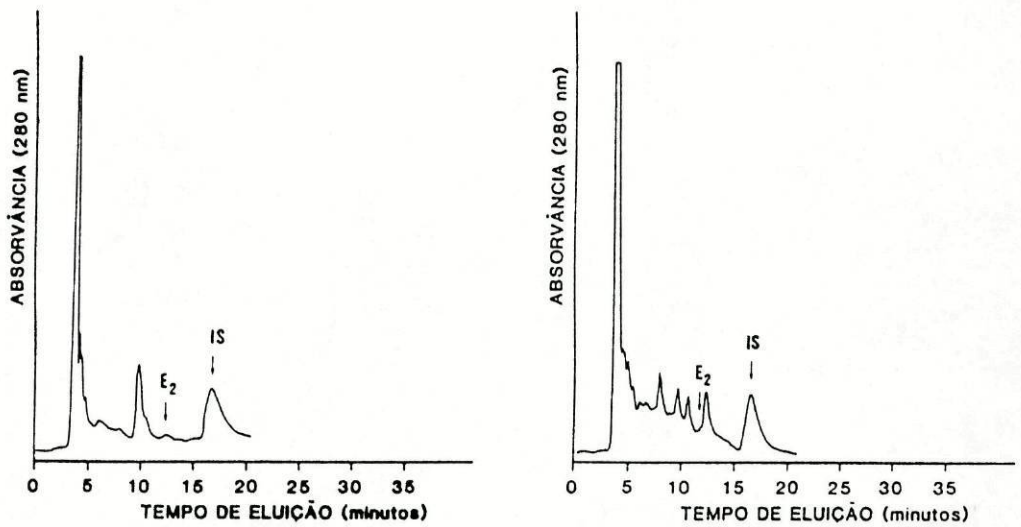


FIG. 55 - Cromatogramas dos esteróides, após separação por HPLC, das fracções metanólicas aquosas (80 %) de *Mytilus*, machos e fêmeas, da colheita de 11.07.83. E_2-estradiol; IS-padrão interno

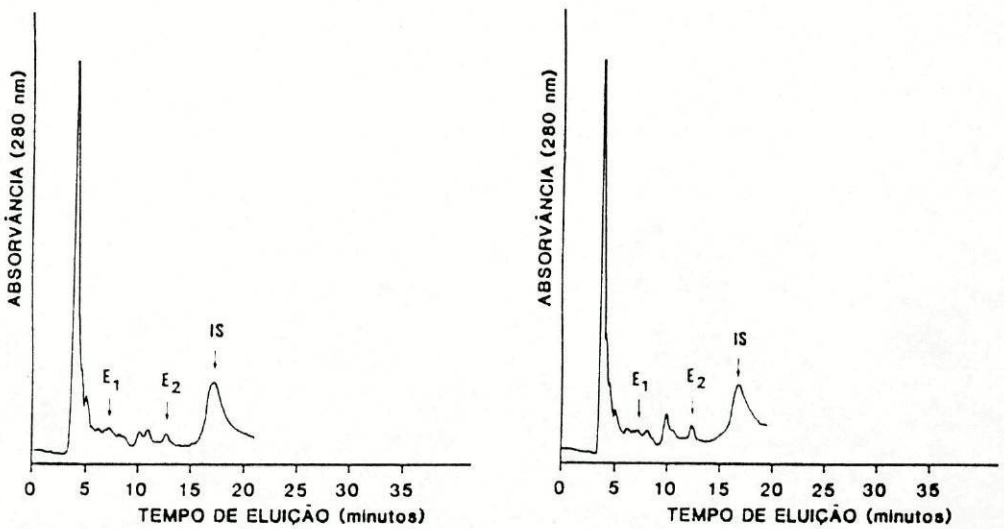


FIG. 56 - Cromatogramas dos esteróides, após separação por HPLC, das fracções metanólicas aquosas (80 %) de *Mytilus*, machos e fêmeas, da colheita de 22.08.83. E_1-estrona; E_2-estradiol; IS-padrão interno

Para a progesterona, figuras 57 e 58, o método de quantificação usado foi o do padrão externo porque para a coluna utilizada, OV-17, os tempos de retenção da progesterona e do padrão interno eram muito próximos, e portanto a separação pouco correcta.

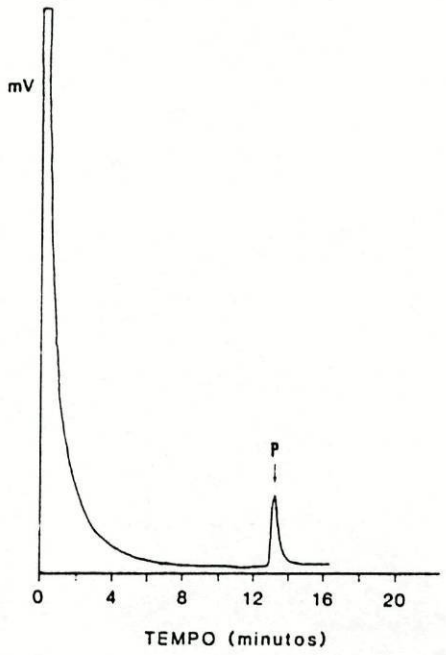


FIG. 57 - Cromatograma da progesterona por separação em Cromatografia de Fase Gasosa (GLC), obtida com a coluna OV-17 a 3‰

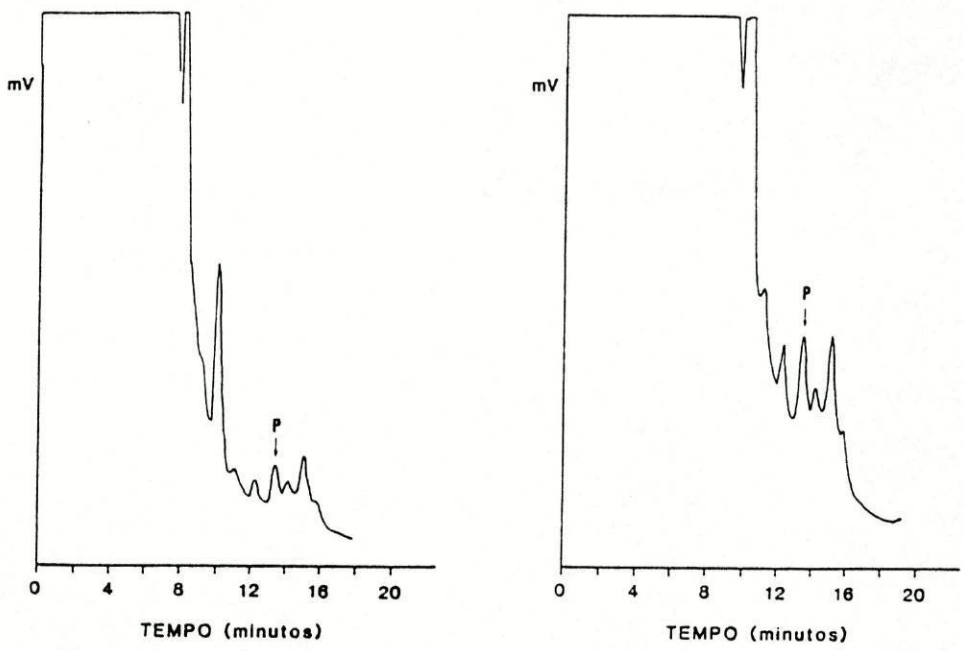


FIG. 58 - Cromatogramas obtidos em GLC da fracção de progesterona recolhida em HPLC de *Mytilus*, machos e fêmeas, da colheita de 11.07.83

Para a fracção referente à testosterona já foi usado o método do padrão interno, figuras 59 e 60. Contudo, a difícil identificação do pico impediu a sua quantificação.

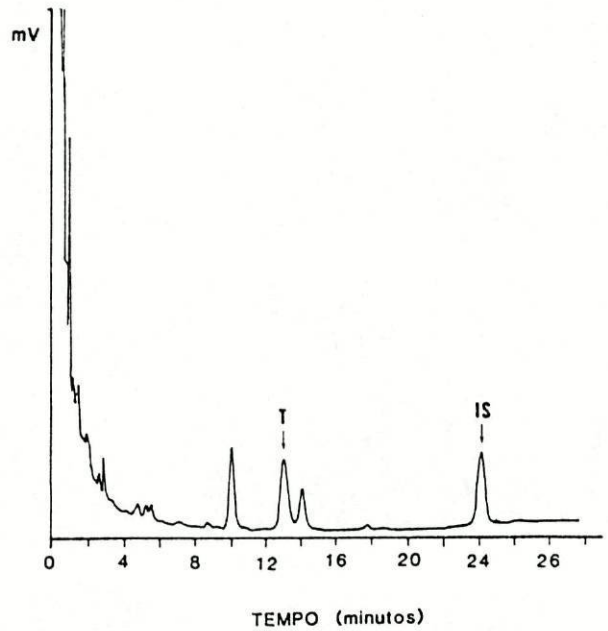


FIG. 59 - Cromatograma dos derivados TMS da testosterona e do padrão interno por separação em GLC com a coluna SP-2100 a 3°/oo. **T**-testosterona; **IS**-padrão interno

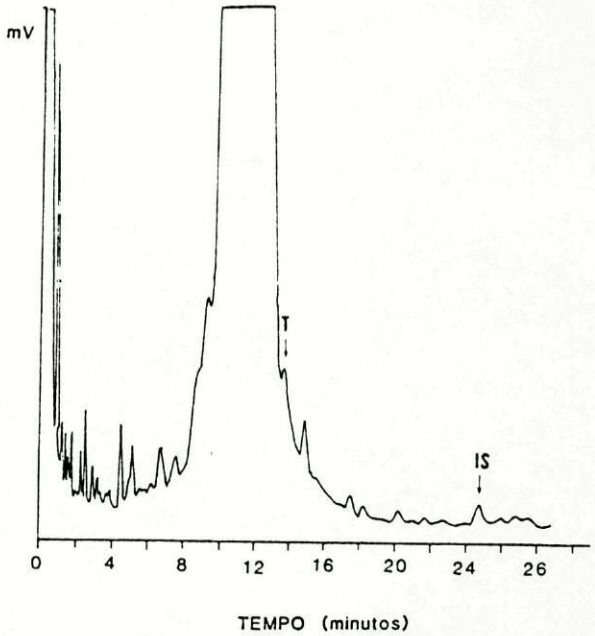


FIG. 60 - Cromatograma obtido em GLC, após sililação da fracção recolhida em HPLC, referente à testosterona dos machos da colheita de 22.08.83. **T**-testosterona; **IS**-padrão interno

Os níveis de progesterona foram calculados em ng/g de peso fresco e estão representados no quadro 4.

Embora não sejam perfeitamente coincidentes, os gráficos referentes à separação e quantificação da progesterona por GLC e HPLC (Fig. 61 e 62) mostram no entanto o mesmo sentido nas variações.

Os níveis encontrados de progesterona apresentam dois máximos, um em Julho e outro em Outubro. O máximo de Julho é mais evidente nas fêmeas que nos machos na quantificação em HPLC, mas, quer num método quer no outro, os valores doseados nas amostras correspondentes às fêmeas foram ligeiramente superiores aos detectados para os machos.

QUADRO 4 - Níveis de progesterona das amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas, expressos em ng/g peso fresco

Data das colheitas	PROGESTERONA (ng/g peso fresco) (GLC)		PROGESTERONA (ng/g peso fresco) (HPLC)	
	♂	♀	♂	♀
14.12.82	10,14	6,39	-	-
4.01.83	10,82	9,45	22,91	14,14
25.01.	7,00	7,31	-	-
17.02.	3,96	6,81	-	-
28.03.	6,36	7,56	-	-
9.05.	4,05	7,36	-	-
30.05.	9,08	23,79	8,92	14,03
29.06.	20,52	37,90	9,82	28,95
11.07.	30,42	42,83	10,43	19,85
1.08.	3,80	8,48	ND	8,54
22.08.	9,05	4,20	11,98	12,26
20.09.	4,19	NI	7,10	NI
18.10.	24,78	26,76	23,29	22,61
8.11.	5,30	7,52	14,56	19,43

NI - não injectada
ND - não detectada

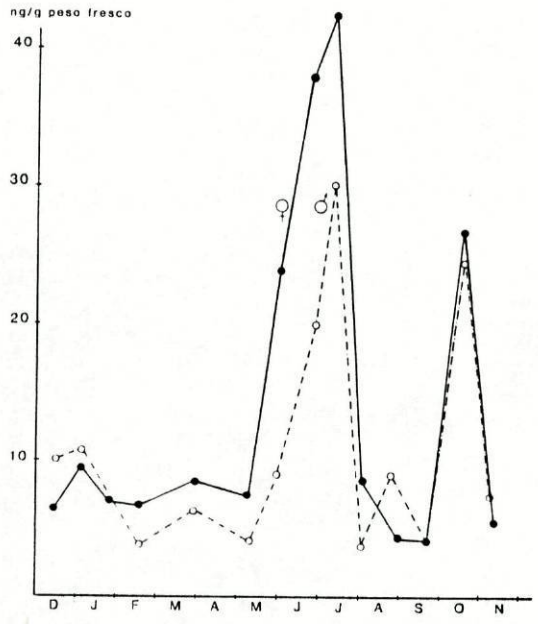


FIG. 61 - Níveis de progesterona nas amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas, medidos por GLC ao longo do ciclo reprodutivo anual. Os níveis são expressos em ng/g peso fresco

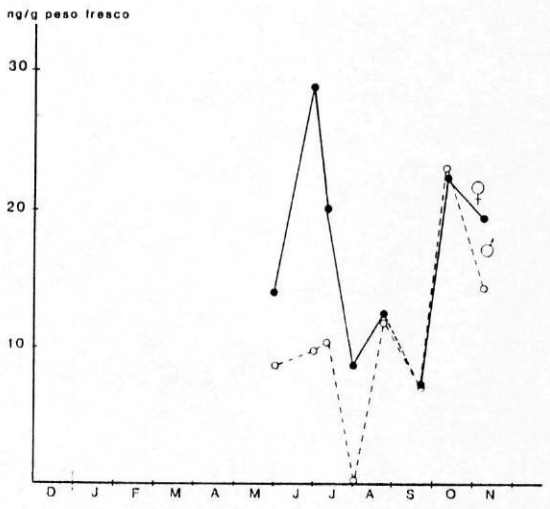


FIG. 62 - Níveis de progesterona nas amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas, medidos por HPLC em alguns meses do ciclo reprodutivo anual. Os níveis são expressos em ng/g peso fresco

Comparando agora estes níveis de progesterona com os valores achados para os índices de maturação da gónada (Fig. 8), verifica-se que os valores mínimos encontrados no mês de Agosto, para os machos e fêmeas, correspondem ao valor mais baixo do índice de maturação da gónada, e o máximo de Outubro a um valor máximo do índice de maturação. Quanto ao máximo encontrado para o mês de Junho, correspondeu a um período em que o índice de maturação se manteve bastante constante, e em que fases de postura parcial alternavam com fases de redesenvolvimento muito rápido.

Os níveis de estradiol e estrona apresentados (em ng/g peso fresco), correspondendo em alguns casos a uma fracção eventualmente não pura, são os valores calculados por HPLC (Quadro 5).

QUADRO 5 - Níveis de estradiol e estrona nas amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas, expressos em ng/g peso fresco

Data das colheitas	ESTRADIOL (ng/g peso fresco)		ESTRONA (ng/g peso fresco)	
	♂	♀	♂	♀
14.12.82	0,021	0,023	0,048	0,045
4.01.83	ND	ND	ND	3,08
24.01.	2,50	2,50	ND	ND
17.02.	0,038	0,053	0,055	0,085
28.03.	ND	3,62	ND	ND
9.05.	13,81	15,30	2,41	4,15
30.05.	vst	vst	2,36	1,85
29.06.	ND	ND	ND	ND
11.07.	1,56	vst	ND	ND
1.08.	ND	ND	ND	ND
22.08.	1,81	1,08	6,39	4,41
20.09.	1,16	-	ND	-
18.10.	vst	1,37	2,16	ND
8.11.	7,37	12,25	2,61	4,38

ND - não detectada
vst - vestígios

Pelos gráficos das figuras 63 e 64, que representam a variação nos valores obtidos para estes dois esteróides ao longo do ciclo reprodutivo, podemos verificar, em comparação com os gráficos obtidos para a progesterona, uma relação inversa na variação dos valores. Assim, ao mínimo da progesterona encontrado no mês de Maio corresponderam valores máximos para o estradiol e estrona doseados nos machos e fêmeas. Aos valores máximos de progesterona de Junho e Outubro corresponderam valores muito baixos, e mesmo não detectáveis, de estradiol e estrona.

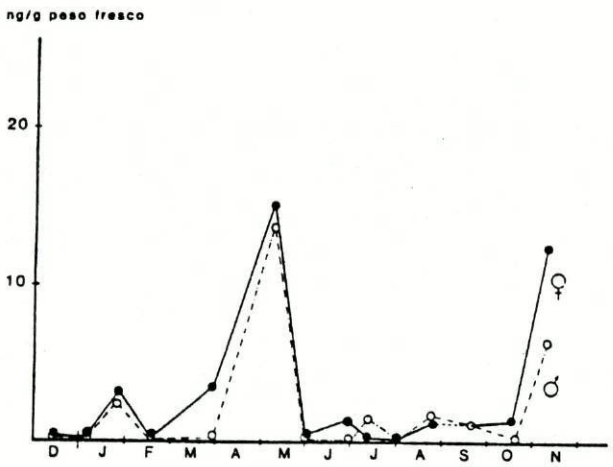


FIG. 63 - Níveis de estradiol nas amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas, medidos por HPLC, ao longo do ciclo reprodutivo. Os níveis são expressos em ng/g peso fresco

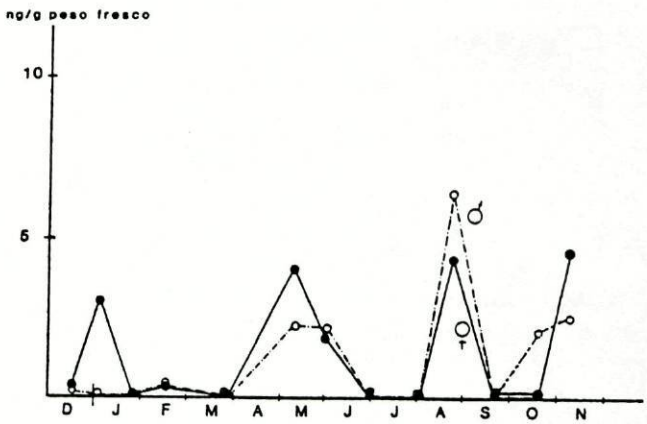


FIG. 64 - Níveis de estrona nas amostras de *Mytilus*, machos e fêmeas, medidos por HPLC, ao longo do ciclo reprodutivo. Os níveis são expressos em ng/g peso fresco

Para o estradiol e estrona não apresentaremos a quantificação por GLC, mas apenas uma indicação das quantidades relativas (Quadro 6), pelo facto do sistema utilizado não permitir para os níveis encontrados um rigor absoluto. Porém, comparando os quadros 5 e 6 verifica-se que existe uma concordância no sentido da variação encontrada.

A partir dos níveis de progesterona e estrogénios (estradiol + + estrona) obtidos nas amostras colhidas ao longo do ano (Quadros 4 e 5) e da percentagem de animais em cada uma das fases avaliada nas amostras que nos serviram para calcular o índice de maturação da gónada

QUADRO 6 - Quantidades relativas em estradiol e estrona obtidas por Cromatografia de Fase Gasosa (GLC), a partir das fracções recolhidas por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), das amostras de *Mytilus*

Data das colheitas	**ESTRADIOL**	**ESTRONA**
14.12.82	+	ND
4.01.83	ND	++
25.01.	+	ND
17.02.	+	ND
28.03.	+	ND
9.05.	++	++
30.05.	+	++
29.06.	ND	ND
11.07.	++	ND
1.08.	ND	ND
22.08.	++	+++
20.09.	+++	ND
18.10	++	+
8.11.	+	+++

A ordem de grandeza dos valores é representada de + a +++

0 - 2 ng/g peso fresco	+
2 - 5 " " "	++
5 - 10 " " "	+++

ND - não detectado(a)

(Quadro 3), foi possível fazer um cálculo matemático dos níveis daquelas hormonas existentes nos animais em cada fase do ciclo.

Para obter este resultado considerámos para cada hormona um sistema de equações cujas incógnitas foram os níveis existentes em cada fase, afectadas de um índice correspondente à percentagem de animais nessa fase (Quadro 7).

QUADRO 7 - Percentagem de animais em cada uma das fases do ciclo reprodutivo e níveis de progesterona e de estrogénios em cada colheita

Data das colheitas	FASES (%)								HORMONAS	
	d_1	d_2	d_3	d_4	s_3	s_2	s_1	0	PROGESTERONA (ng/g peso fresco)	ESTROGÉNIOS (Estradiol + Estrona) (ng/g peso fresco)
14.12.82	-	16,7	66,7	-	16,7	-	-	-	8,27	0,07
4.01.83	-	20,0	50,0	20,0	10,0	-	-	-	10,14	1,54
25.01.	-	5,9	41,2	41,2	5,9	5,9	-	-	7,16	2,50
17.02.	-	11,8	5,9	82,4	-	-	-	-	5,39	0,12
7.03.	5,6	22,2	27,8	-	5,6	16,7	22,2	-	-	-
28.03.	23,5	29,4	17,6	11,8	5,9	11,8	-	-	6,96	1,61
19.04.	17,6	29,4	29,4	-	17,6	-	5,9	-	-	-
9.05.	15,8	10,5	36,8	-	-	10,5	26,3	-	5,71	17,84
30.05.	6,3	18,8	37,5	-	-	18,8	18,8	-	16,44	2,11
29.06.	-	13,3	40,0	6,7	-	6,7	13,3	20,0	29,21	-
11.07.	23,5	11,8	11,8	-	-	29,4	5,9	17,6	36,63	0,78
1.08.	-	-	6,3	-	12,5	12,5	6,3	62,5	6,14	-
22.08.	-	29,4	52,9	5,9	-	5,9	-	5,9	6,63	6,85
20.09.	-	-	5,6	83,3	11,1	-	-	-	4,10	1,16
18.10.	-	22,2	22,2	38,9	16,7	-	-	-	25,77	1,78
8.11.	13,3	20,0	26,6	20,0	13,3	6,7	-	-	6,41	13,29

Para cada hormona apenas usámos neste cálculo os valores correspondentes às amostras dos meses em que os níveis foram mais elevados, para evitar os erros resultantes da imprecisão da medida utilizada.

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na figura 65; os intervalos relativos a cada fase são proporcionais aos tempos de duração calculados. Este cálculo foi efectuado a partir das frequências relativas encontradas pela análise de todos os cortes histológicos realizados, considerando-se o tempo relativo proporcional à frequência relativa.

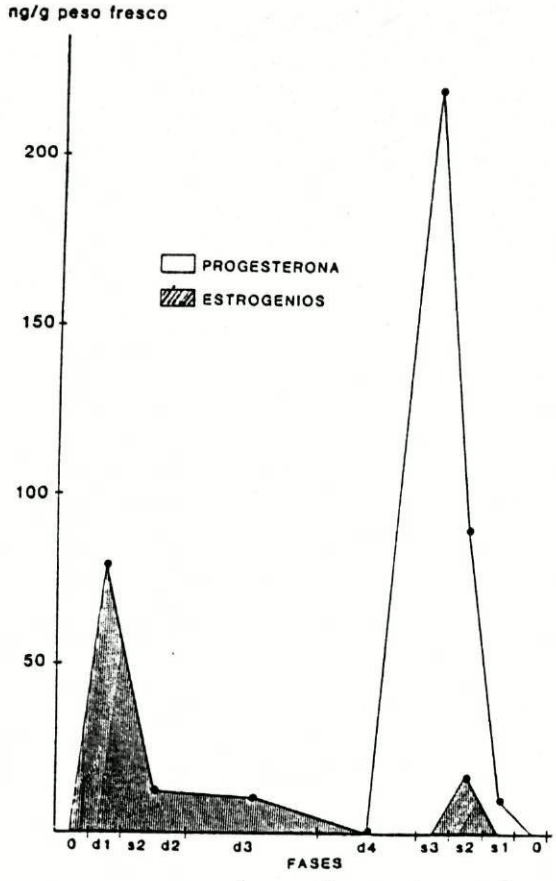


FIG. 65 - Cálculo da evolução dos níveis de progesterona e estrogénios ao longo do ciclo reprodutivo de *Mytilus*

A análise do gráfico obtido confirma as observações já efectuadas, ou seja, que os níveis mais elevados de estrogénios ocorrem nas primeiras fases de desenvolvimento da gónada, enquanto que os níveis mais elevados de progesterona ocorrem nas primeiras fases da postura. É contudo importante verificar que na fase s_2 (redesenvolvimento) ocorre também a existência de um pequeno pico de estrogénios simultaneamente com um nível elevado de progesterona.

3 - RESULTADOS OBTIDOS NOS MANTOS DE *Mytilus*

Os níveis de progesterona, testosterona e estradiol medidos por RIA nas gónadas de *Mytilus* machos e fêmeas, e referidos a g de peso fresco e a mg de proteína, estão representados nos quadros 8 e 9.

Porque os valores encontrados nos machos e nas fêmeas apresentavam pouca diferença entre eles, decidimos, para facilitar a análise dos dados, representar graficamente a média dos valores dos dois sexos (Fig. 66 e 67).

QUADRO 8 - Níveis de progesterona, testosterona e estradiol nos mantos de *Mytilus*, macho e fêmea

Data das colheitas	PROGESTERONA (ng/g peso fresco)		TESTOSTERONA (pg/g peso fresco)		ESTRADIOL (pg/g peso fresco)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
13.01.86	0,82	2,52	330	50	58,90	53,40
25.02.	2,48	2,51	0	120	36,51	36,61
25.03.	-	2,21	140	320	50,61	78,45
23.04.	2,27	2,75	390	50	40,75	24,91
22.05.	1,34	1,59	110	2 500	23,63	26,32
25.06.	0,89	2,96	150	170	3,04	3,65
24.07.	4,38	3,25	40	80	2,55	4,50
23.09.	-	2,83	80	80	30,65	31,45
2.12.	5,99	4,35	48	50	51,85	50,73

QUADRO 9 - Níveis de progesterona e estradiol nos mantos de *Mytilus*, macho e fêmea

Data das colheitas	PROGESTERONA (pg/mg proteína)		ESTRADIOL (pg/mg proteína)	
	♂	♀	♂	♀
13.01.86	11,68	31,00	0,84	0,65
25.02.	41,20	24,33	0,61	0,36
25.03.	-	31,94	0,69	1,13
23.04.	19,27	30,39	0,35	0,28
22.05.	19,23	17,77	0,34	0,29
25.06.	11,96	44,59	0,04	0,06
24.07.	48,83	35,64	0,03	0,05
23.09.	-	40,20	0,39	0,45
2.12.	63,00	39,32	0,54	0,46

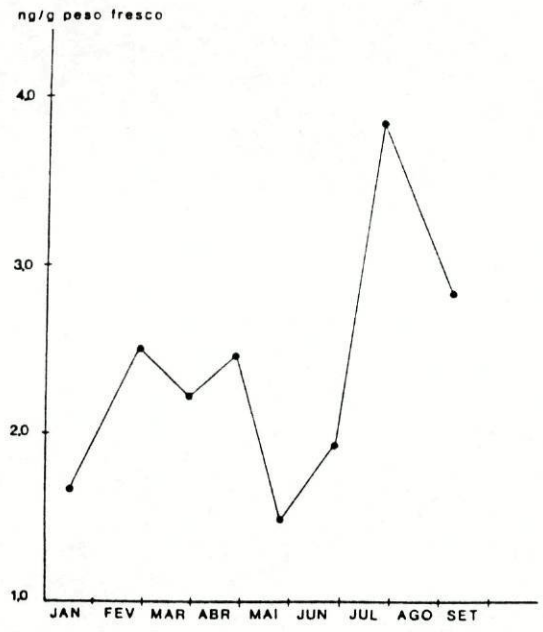


FIG. 66 - Níveis de progesterona nos mantos de *Mytilus*, expressos em ng/g peso fresco

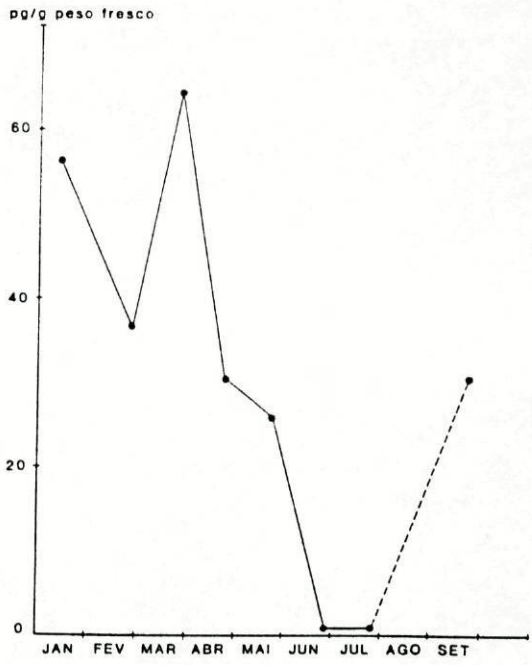


FIG. 67 - Níveis de estradiol nos mantos de *Mytilus*, expressos em pg/g peso fresco

Os valores da progesterona mostram um sentido de variação idêntico ao que tínhamos encontrado para o animal inteiro (Fig. 61 e 62). O ligeiro desfazamento que encontrámos pode ser explicável pelo intervalo de três anos existente entre as duas amostras. Como já foi anteriormente descrito, a evolução do ciclo reprodutivo é influenciada por um certo número de factores ambientais e endógenos, que fazem com que as fases gametogénicas não apresentem obrigatoriamente o mesmo padrão todos os anos.

Analisando agora os níveis de estradiol (Fig. 67) podemos observar valores mais elevados em Março, possivelmente devidos ao começo da actividade gametogénica, que, como tínhamos assinalado anteriormente, correspondiam às fases primárias de desenvolvimento (d_1, d_2 e d_3). Foi possível estabelecer uma correlação negativa entre estes valores e os níveis da espessura dos mantos (Quadro 10). Estes resultados estão de acordo com o que havíamos posto em evidência para o animal inteiro (Fig. 65).

QUADRO 10 - Proteína e lípidos totais (mg/g peso fresco), índice da espessura do manto (peso fresco/área), nos mantos de *Mytilus*, macho e fêmea

Data das colheitas	PROTEÍNA (mg/g peso fresco)		EXTRACTO LIPÍDICO (mg/g peso fresco)		INDICE DA ESPESSURA DO MANTO	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
13.01.86	70,2 ± 1,6	81,3 ± 3,4	-	-	-	-
24.02.	60,2 ± 1,1	101,1 ± 2,1	7,77	22,52	0,129	0,180
25.03.	73,0 ± 0,7	69,2 ± 0,6	11,86	12,01	0,078	0,061
23.04.	117,8 ± 19,4	90,5 ± 2,4	8,44	17,85	0,100	0,074
22.05.	69,7 ± 0,7	89,5 ± 1,5	6,81	14,98	0,108	0,089
25.06.	74,4 ± 1,8	66,4 ± 1,6	11,35	14,13	0,119	0,127
24.07.	89,7 ± 1,8	91,2 ± 1,9	12,80	17,87	0,105	0,162
23.09.	78,4 ± 0,8	70,4 ± 3,2	16,54	21,02	0,174	0,108
2.12.	95,1 ± 0,0	110,6 ± 4,5	15,86	26,37	0,165	0,186

Também nos mantos, tal como tínhamos encontrado para o animal inteiro, os níveis de progesterona foram sempre muito superiores aos encontrados para o estradiol.

Os valores da testosterona nos mantos de *Mytilus*, tal como se pode ver no quadro 8, apresentam grandes oscilações entre os machos e as fêmeas, sendo difícil, tal como tinha acontecido para o animal inteiro, tirar qualquer conclusão, a não ser a certeza da sua presença.

Outros parâmetros medidos na gónada foram as concentrações de proteína, de lípidos totais e o índice da espessura do manto, representados no quadro 10.

O teor de lípidos totais relacionados com o peso fresco (Fig. 68), apresentam variações cíclicas mais discretas do que as obtidas no animal inteiro (Fig. 5), mas apresentando também um máximo em Fevereiro e o outro no Verão.

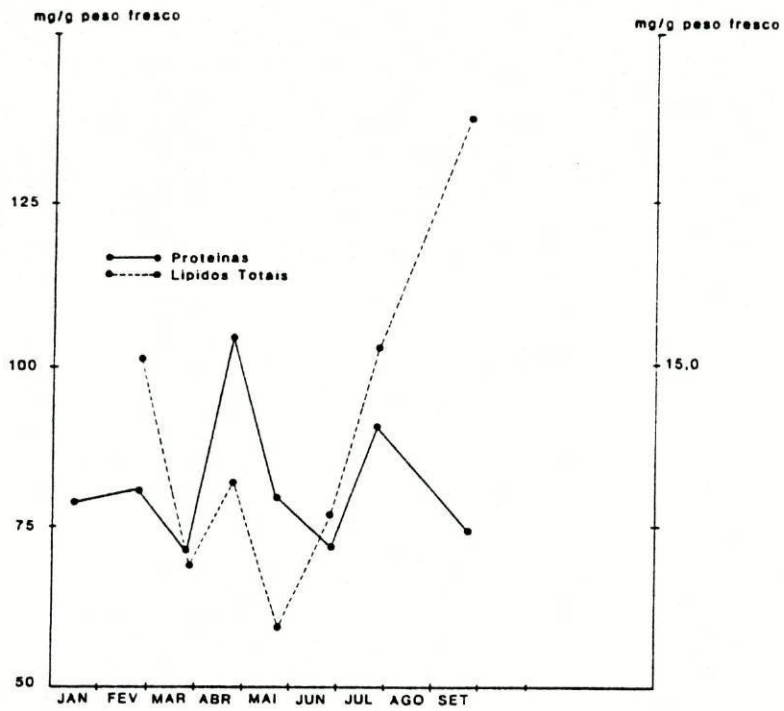


FIG. 68 - Variações sazonais no teor de lípidos totais (mg/g peso fresco) e proteínas (mg/g peso fresco), nos mantos de *Mytilus*

Quanto aos valores encontrados para as proteínas, não temos termo de comparação com os valores do animal inteiro, mas podemos assinalar que até à postura de Verão (fins de Junho) eles seguem de perto as variações dos lípidos totais; no entanto, a partir de Julho (época de recuperação da gónada) nota-se uma inversão nos valores destes dois parâmetros, mostrando que os mesmos intervêm nas fases de desenvolvimento da gónada.

O índice da espessura dos mantos mostrou uma certa homogeneidade entre os valores do fim do Inverno e Primavera, apresentando uma subida brusca (cerca de 50%) no começo do Verão, coincidente com o aumento nos teores de lípidos totais e proteínas.

DISCUSSÃO

Os ciclos gametogénicos sazonais são um fenómeno bem estudado em muitos invertebrados marinhos. Cada espécie apresenta uma variedade de adaptações genéticas e não genéticas que coordenam estes acontecimentos reprodutivos com o meio ambiente, com vista a atingir-se um máximo sucesso reprodutivo.

Embora os ciclos reprodutivos de numerosas espécies bivalves tenham sido largamente estudados por Geese (1959), Seed (1975) e Sastry (1979), entre outros, só parcialmente se conhecem as interacções complexas entre alguns dos factores exógenos - como a disponibilidade de alimentos, a temperatura, a salinidade -, e os factores endógenos - como as reservas, o ciclo hormonal, o genotipo -, variáveis que determinam a iniciação e duração da gametogénese e emissão dos gâmetas.

Os mexilhões das amostras colhidas ao longo dos anos de 1982 e 1983 na Ria de Aveiro, mostraram um ciclo gametogénico característico dos mitilídeos que vivem em ambientes onde os invernos são suaves e os verões quentes. As variações que detectámos relacionaram-se não só com o número e desenvolvimento das células germinativas, mas também com o ciclo de armazenamento de reservas no tecido conjuntivo interfolicular. Assim, o volume do manto ocupado pelas células adipogranulares (AG) e vesiculares do tecido conjuntivo (VTC) aumentou ao longo do Verão, seguindo-se um declínio nos meses de Inverno, quando ocorreu o desenvolvimento dos gâmetas. Na Primavera, com o aparecimento das posturas parciais, deu-se um novo período de desenvolvimento destas células, culminando com uma nova emissão de gâmetas em Julho e Agosto. Facto idêntico foi descrito por Lowe et al. (1982) para duas populações da costa da Grã-Bretanha. Segundo estes autores, a frequência e sazonalidade do ciclo reprodutivo estava dependente da distribuição geográfica. Assim, a população que habitava a região norte apresentava uma única época de emissão de gâmetas na Primavera, enquanto que os animais localizados mais a sul, num clima mais temperado, tinham duas épocas de postura - Primavera e fins do Verão. Ainda durante o período inactivo ou neutro da reprodução o volume ocupado pelos gâmetas era zero e o

volume das células AG de 50-60%. Com o começo da gametogénese os folículos aumentavam em tamanho e o volume das células AG diminuia na razão inversa do desenvolvimento dos gâmetas. Imediatamente antes da postura os gâmetas em desenvolvimento atingiam 70 a 80% da fracção total e as células AG o valor mínimo.

A relação da temperatura com a gametogénese foi posta em evidência por um trabalho de Kennedy (1979), em *Mytilus edulis* e *Aulacomya maoriana* da costa da Nova Zelândia (43° 35' S, 172° 47' E), estabelecendo uma relação entre a maturação dos gâmetas e a diminuição da temperatura das águas no Outono e Inverno. Comparando os nossos resultados com os deste autor, verificamos que existe uma grande semelhança na sequência das fases da gametogénese, com seis meses de diferença.

Se compararmos os valores das temperaturas da água (Fig. 1) com os índices médios de maturação (Fig. 8) verificamos que foi a temperaturas mais baixas que o índice atingiu o seu ponto mais elevado no Inverno, e que a subida da temperatura na Primavera deu início a uma época de emissão de gâmetas para ambos os sexos, no princípio de Março, com o seu máximo de emissão em Julho e Agosto, quando também foram medidos os máximos para a temperatura da água.

Hrs-Brenko (1971), num estudo efectuado no Mar Adriático, em *Mytilus galloprovincialis*, verificou também que a temperatura influenciava a emissão dos gâmetas, acelerando-a ou retardando-a, bem como a restauração e maturação das gónadas.

As épocas de reprodução de *Mytilus edulis* da costa atlântica foram publicadas por vários autores. De entre eles, Seed (1975) descreveu posturas repetidas em *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovinvialis* da costa da Irlanda entre o princípio da Primavera até ao fim do Verão. O redesenvolvimento da gónada dava-se em Outubro-Novembro e a gametogénese ocorria durante o Inverno, até atingir o máximo de maturação em Fevereiro-Março. Durante os meses da Primavera a postura parcial prosseguia, aparecendo alguns animais com os folículos completamente vazios. Este período era seguido de um período de gametogénese rápida, tendo as gónadas atingido novamente o seu máximo de maturação em Junho-Julho. Durante Julho-Setembro, por vezes mais cedo, dava-se novo

período de emissão de gâmetas, de maneira a que os folículos ficavam vazios de oócitos e espermatozóides. A partir de Setembro e Outubro o tecido conjuntivo aparecia progressivamente mais abundante e com maior número de células de reserva. Esta sequência é em tudo idêntica à que encontrámos, apenas desfazada em cerca de um mês.

A salinidade é também um factor a considerar e que, segundo Bayne (1965), influenciava principalmente a percentagem de fertilização e sobrevivência das larvas. Os valores medidos para a salinidade (Fig. 2) mostram que as épocas de emissão de gâmetas da Primavera e Verão ocorreram sempre que a salinidade era mais elevada (acima de 30 °/oo).

Outro factor que condiciona o processo de maturação sexual é, como vimos, a quantidade de alimentos existente nas águas. Kautsky (1982), num estudo efectuado em *Mytilus* no Mar Báltico, associava a maturação rápida da gónada, e o concomitante aumento de peso dos animais, com o aparecimento do fitoplâncton na Primavera.

Na figura 4 verificamos que para as nossas amostras o peso dos animais, e sobretudo o peso seco, apresentou um aumento significativo no Verão logo a seguir à postura, relacionada também com a quantidade de fitoplâncton presente, permitindo um crescimento e acumulação de reservas nutrientes.

Segundo Gabbot e Bayne (1973) havia uma marcada mudança sazonal na utilização dos hidratos de carbono como principal reserva energética no Verão e a utilização da proteína como principal reserva no Inverno.

O glicogénio aumenta rapidamente durante o Verão. Para Kluytmans et al. (1985) os hidratos de carbono eram os compostos químicos mais importantes na fermentação anaeróbica, chegando o *Mytilus edulis* a armazená-los para cima de 50% do seu peso seco, o que não acontece em relação aos lípidos. Este facto pode levar a subestimar o papel fisiológico destes últimos compostos, se tivermos em conta as pequenas quantidades em que se encontram no animal.

A figura 6 apresenta a variação sazonal no conteúdo dos lípidos totais das amostras analisadas. Podemos verificar que o aumento significativo do teor lipídico se dá no Inverno, atingindo um patamar na Primavera, e com uma subida menor no Verão, logo após a emissão dos

gâmetas. As fêmeas apresentaram sempre um teor mais elevado em lípidos, o que pode ser explicado por as suas células germinativas serem locais onde se dá a acumulação de gordura. Os valores que obtivemos para os lípidos totais, quadros 1 e 2, mantiveram-se perto dos 10% do peso seco. Segundo Dare e Edwards (1975), Pieters et al. (1980) e Joseph (1982), só 10% dos lípidos totais (cerca de 1% do peso seco) teriam uma função estrutural, enquanto os restantes serviriam de produto de reserva.

Verificámos que após o stress do Inverno, quando os animais recuperavam da escassez de alimentos, e com uma quantidade razoável de fitoplâncton, poucos lípidos foram acumulados, não obstante se saber que as algas, que contribuem para a maior parte da dieta, serem consideravelmente ricas em lípidos. Aparentemente estes lípidos da dieta foram metabolizados, favorecendo uma gametogénese rápida, enquanto o glicogénio e as proteínas eram armazenados. Para Kluytmans et al. (1985) nos estados finais da gametogénese haveria uma subida nos lípidos neutros no manto, sem a consequente descida nos outros tecidos, o que seria indicativo de que se daria uma síntese *de novo* dos ácidos gordos. Efectivamente, aquele autor verificou um aumento na actividade da acetil-CoA carboxilase e da sintetase dos ácidos gordos no manto das fêmeas, mas não no dos machos, de *Mytilus*, no período que antecedia a postura.

Ballantyne (1984) observou que os lípidos na forma de acilcarnitinas constituiam o substrato preferencial para as mitocôndrias do hepatopâncreas de *Mytilus*, incapazes de oxidar o piruvato, α-glicerofosfato, fumarato e oxalacetato.

O "timing" e a duração do ciclo reprodutivo de *Mytilus* referentes à activação da gónada, crescimento, gametogénese, emissão de gâmetas e subsequente regressão da gónada, eram controlados pela interacção de factores ambientais, e ainda por factores endógenos controlados pelo próprio animal (Lubet, 1959).

No capítulo anterior descrevemos a presença de alguns esteróides nas amostras de *Mytilus*. Além da progesterona, androstenediona, testosterona, estradiol e estrona, detectámos ainda outros compostos resul-

tantes do metabolismo destes esteróides, como a androsterona, androstanediol e a diidrotestosterona, entre outros. A hipótese levantada de uma possível variação nos níveis de alguns destes esteróides ao longo do ciclo reprodutivo foi desenvolvida e conduziu-nos a resultados que procuraremos relacionar com a época do ano, ou melhor, com a fase de maturação.

Verificámos que depois de um grau de desenvolvimento máximo (Fig. 8), fase d_4, atingido para ambos os sexos no mês de Fevereiro, se seguiu uma emissão parcial de gâmetas com começo em Março e com a consequente recuperação da gónada, sem no entanto se atingir a maturação verificada no Inverno. Em Maio e Junho a maioria dos animais apresentava a fase de desenvolvimento d_3. Seguiu-se a postura de Verão, encontrando-se no princípio do mês de Agosto cerca de 80% das fêmeas com os folículos do manto vazios de gâmetas. Surgiu depois uma fase rápida de multiplicação das células germinativas, com o aparecimento de novos gâmetas, atingindo um máximo de desenvolvimento nos meses de Setembro e Outubro.

Analisando os gráficos correspondentes aos níveis de progesterona medidos ao longo do ano (Fig. 61 e Fig. 62) notamos que os máximos aparecem em períodos de desenvolvimento mais intenso. Foi no período imediatamente antes da emissão de gâmetas do Verão que se verificou o pico mais elevado de progesterona, com um valor ligeiramente mais alto nas fêmeas do que nos machos. A seguir a nova fase de postura os níveis voltaram a subir, dando a ideia de que os máximos de progesterona correspondem a fases de maior actividade gametogénica.

Os níveis de estradiol (Fig. 63) mostram dois valores máximos, um em Maio e o outro em Novembro, quer para os machos quer para as fêmeas, correspondendo o primeiro a uma fase de desenvolvimento e o outro ao termo do período de desenvolvimento máximo no Outono.

Para a estrona (Fig. 64) o padrão é idêntico ao da distribuição dos valores do estradiol, apresentando contudo um terceiro pico logo a seguir à emissão de gâmetas de Verão, e coincidente com uma época em que cerca de 50% dos machos e fêmeas observados se encontravam no estado de desenvolvimento d_3.

Quando pretendemos analisar os nossos resultados, comparando-os com outros já publicados e referentes também a invertebrados marinhos, somos levados a fazê-lo com o equinoderme *Asterias rubens*, a espécie onde o estudo da biossíntese de esteróides tem sido feita de uma forma mais completa.

Dieleman e Schoenmakers (1979) e Schoenmakers e Dieleman (1981), usando o radioimunoensaio, mediram os níveis de progesterona e estrona nos ovários e ceco pilórico nas fêmeas desta espécie.

Segundo estes autores os níveis de progesterona encontrados nos ovários eram elevados na fase 1 (desenvolvimento primário), decresciam durante a fase 2, e permaneciam baixos nas fases 3 e 4. No ceco pilórico os níveis de progesterona eram altos nas fases 1 e 2, baixos na 3 e aumentavam para níveis mais altos durante a fase 4, antes da postura. As variações dos níveis de progesterona e a presença de células com as características das células produtoras de esteróides nos ovários, e os dados bioquímicos obtidos, sugeriam que a progesterona teria uma função específica no crescimento dos oócitos e seria preferencialmente sintetizada no ceco pilórico. Para a estrona os níveis encontrados nos ovários eram baixos, mas aumentavam no fim da fase 1 (começo da vitelogénese). No ceco pilórico, contudo, os níveis de estrona permaneciam baixos através de todo o ciclo reprodutivo.

Estabeleceram também que o máximo encontrado para a estrona nos ovários precedia o máximo de proteína, permitindo pôr a hipótese de que os estrogénios estariam relacionados com a biossíntese de proteínas e possivelmente com a sua incorporação nos oócitos. Voogt e Dieleman (1984) estabeleceram o mesmo padrão de distribuição da progesterona e da estrona nas gónadas e ceco pilórico de especímenes machos de *Asterias rubens*.

Reforçando esta hipótese do envolvimento dos estrogénios na síntese das proteínas na gónada, Van der Plas et al. (1982) verificaram também que o tratamento *in vitro* com 17β-estradiol resultava num aumento significativo dos níveis de RNA.

Schoenmakers et al. (1981), em estudos *in vivo* e após uma injecção diária de 17β-estradiol por um período de 16 dias, constataram que se

dava um aumento no índice de maturação sexual dos animais, quando comparados com os animais controlo. Estudos bioquímicos dos ovários e ceco pilórico de *Asterias rubens* permitiram pôr a hipótese da presença de substâncias idênticas à vitelogenina, que seriam sintetizadas no ceco pilórico e transportadas para os ovários.

Do exposto até aqui verificamos que a estrela-do-mar oferece melhores condições de estudo que o *Mytilus*, não só por ser um invertebrado mais avançado na escala filogenética que este, e portanto com um grau de diferenciação maior, mas também por ser um animal de maiores dimensões. Os orgãos reprodutores (ovário e testículo) e o ceco pilórico estão localizados em cada um dos braços do animal. Proporcionalmente ao peso do corpo, para um espécimen de 250 g, os ovários pesam aproximadamente 50 g (20%) e o ceco pilórico 30 g (12%). Deste modo os estudos são feitos animal a animal.

Passaremos agora a analisar os resultados obtidos nos mantos isolados de *Mytilus*. Em primeiro lugar queremos salientar que o método de radioimunoensaio usando o ^{125}I para o doseamento dos esteróides mostrou ser altamente específico, com reacções cruzadas pouco significativas (ver Materiais e Métodos), não necessitando nem de purificações prévias, como acontece nos métodos cromatográficos, nem da utilização de quantidades de material biológico tão elevadas como as usadas quando trabalhámos com o animal inteiro.

Os níveis que medimos para a progesterona, sendo consideravelmente mais elevados do que os encontrados para o estradiol, levam a supor que esta hormona será também, neste animal, um precursor natural e directo para a síntese de outros esteróides.

O máximo de estradiol foi encontrado nos meses de maior actividade gametogénica, fins do Inverno e Primavera, época de fases de postura parcial logo seguida de fases de redesenvolvimento, o que vem confirmar a observação feita anteriormente de que os níveis mais elevados de estrogénios ocorriam nas primeiras fases de desenvolvimento da gónada.

Comparando a distribuição dos valores da progesterona e do estradiol nos mantos ao longo dos meses, podemos verificar uma inversão destes, e ainda que os mínimos de progesterona correspondem a fases de

postura, aliás de acordo com os índices de espessura mais baixos.

Para finalizar não queremos deixar de assinalar que, ao trabalharmos com os mantos isolados, deixámos de parte os esteróides que existem no orgão regulador do metabolismo deste animal, o hepatopâncreas, o qual, estamos convencidos, contém quantidades significativas de progesterona, bastante mais do que de estradiol, como aliás acontece em *Asterias rubens*.

BIBLIOGRAFIA

ANTHEUNISSE, L. (1963). Neurosecretory phenomena in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. *Gen. Comp. Endocr.* 3: 680-681.

ATEN, R.F., EISENFELD, A.J., MACLUSKY, N.J. and HOCHBERG, R.B. (1982). Separation of steroidal estrogens and their major unconjugated metabolites by high performance liquid chromatography. *J. Steroid Biochem.* 16: 447-449.

AUBRY, R. (1962). Étude de l'hermaphrodisme et l'action pharmacodynamique des hormones de Vertébrés chez les Gastéropodes Pulmonés. Thèse Fac. Sc. Univ. Strasbourg. Masson. Paris.

BALLANTYNE, J.S. (1984). Characterization of mitochondria from the hepatopancreas of *Mytilus edulis*. Proc. 1st Int. Congr. Comp. Physiol. Biochem. A 127.

BAYNE, B.L. (1975). Reproduction in bivalve molluscs under environmental stress. In *Physiological ecology of estuarine organisms* (Ed. by F.J. Vernberg), pp. 259-277. University of South Carolina Press. Columbia.

BAYNE, B.L. (1976). Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In *Estuarine Processes* (Ed. by M. Wiley), Vol. I, pp. 432-448. Academic Press. London.

BAYNE, B.L., BUBEL, A., GABBOTT, P.A., LIVINGSTONE, D.R., LOWE, D.M. and MOORE, M.N. (1982). Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. *Mar. Biol. Lett.* 3: 89-105.

BRIDE, J., GRIFFOND, B. (1981). Étude comparée de la gonade d'*Helix aspersa* témoins et tentaculectomisés. *Gen. Comp. Endocr.* 45: 527-532.

BROUSSEAU, D. J. (1978). Spawning cycle, fecundity, and recruitment in a population of soft-shell clam, *Mya arenaria*, from Cape Ann, Massachusetts. *Fishery Bulletin* 76 (1): 155-166.

CHIPPERFIELD, P.N.J. (1953). Observations on the breeding and settlement of *Mytilus edulis* (L.) in british waters. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 32: 449-476.

DARE, P.J. and EDWARDS, D.B. (1975). Seasonal changes in flesh weight and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in the Conway estuary, North Wales. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **18**: 89-97.

DAVENPORT, J. (1983). A comparison of some aspects of the behaviour and physiology of the indian mussel *Perna* (=*Mytilus*) *viridis* and the common mussel *Mytilus edulis* L. *J. Moll. Stud.* **49**: 21-26.

DE LONGCAMP, D., LUBET, P. and DROSDOWSKY, M. (1974). The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *Gen. Comp. Endocr.* **22**: 116-127.

DIELEMAN, S.J. and SCHOENMAKERS, H.J.N. (1979). Radioimunoassays to determine the presence of progesterone and estrone in the starfish *Asterias rubens*. *Gen. Comp. Endocr.* **39**: 534-542.

DI PRISCO, C.L., FULGHERI, F.D. and TOMASUCCI, M. (1973). Identification and biosynthesis of steroids in the marine mollusc *Aplysia depilans*. *Comp. Biochem. Physiol.* **45B**: 303-310.

GABBOTT, P.A. (1976). Energy metabolism. Int. Biol. Progr. 10, Marine Mussels: 293-355 (Ed. by B.L. Bayne). Cambridge University Press. Cambridge.

GABBOTT, P.A. and BAYNE, B.L. (1973). Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **53**: 269-286.

GABE, M. (1955). Particularités histologiques des célules neurosécrétrices chez quelques lamelibranches. *C.R. Acad. Sc.* **240**: 1810--1812.

GARIGNAN, G. LODGE, B.A. and SKAKUM, W. (1983). Quantitative analysis of ethisterone and ethynyl oestradiol preparations by high--performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **281**: 377-380.

GEESE, A.C. (1959). Comparative physiology. Annual reproductive cycles of marine invertebrate. *A. Rev. Physiol.* 21: 547-576.

GERAERTS, W.P.M. and JOOSSE, J. (1975). Control of vitellogenesis and of growth of female accessory sex organs by the dorsal body hormone (DBH) in the hermaphroditic freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocr.* 27: 450-464.

GERAERTS, W.P.M. and ALGERA, L.H. (1976). The stimulating effect of the dorsal body hormone on cell differentiation in the female accessory sex organs of the hermaphrodite freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocr.* 29: 109-118.

GERAERTS, W.P.M. and BOHLKEN, S. (1976). The control of ovulation in the hermaphroditic freshwater snail *Lymnaea stagnalis* by the neurohormone of the caudodorsal cells. *Gen. Comp. Endocr.* 28: 350--357.

GOMOT, L. (1974). Culture *in vitro* de la glandule hermaphrodite de l'escargot *Helix aspersa* en présence de stéroïdes. *C. R. Soc. Biol.* 168 (6-7): 837.

GOMOT, L. (1982). Endocrinologie de la sexualité et de la reproduction chez les pulmonés stylommatophores. *Malacologia* 22: 115-119.

GOMOT, L. and COURTOT, A.M. (1979). Étude en culture *in vitro* du controle endocrine de la glande a albumen chez l'escargot *Helix aspersa*. *Malacologia* 18: 361-367.

GOTTFRIED, H. and DORFMAN, R.I. (1970). Steroids of invertebrates. IV. On the optic tentacle-gonadal axis in the control of the male-phase ovotestis in the slug (*Ariolimax californicus*). *Gen. Comp. Endocr.* 15: 101-119.

GOTTFRIED, H. and DORFMAN, R.I. (1970). Steroids of invertebrates. VI. Effect of tentacular homogenates *in vitro* upon post-androstenedione metabolism in the male phase of *Ariolimax californicus* ovotestis. *Gen. Comp. Endocr.* 15: 139-142.

GRIFFITHS, R.J. (1977). Reproductive cycles in littoral populations of *Choromytilus meridionalis* (Kr) and *Aulacomya ater* (Molina) with a quantitative assessement of gamete production in the former. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**: 53-71.

GRUFFYDD, LL.D., HUXLEY, R. and CRISP, D.J. (1984). The reduction in growth of *Mytilus edulis* in fluctuating salinity regimes measured using laser diffraction patterns and the exaggeration of this effect by using tap water as the diluting medium. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **64**: 401-409.

HEFTMANN, E. and TSYH LIN, J. (1982). Steroid analysis by high--performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **5** (1): 121-173.

HERLIN-HOUTEVILLE, P. and LUBET, P.E. (1975). The sexuality of pelecypod molluscs. In *Intersexuality in the Animal Kingdom* (Ed. by R. Reinboth), pp. 179-187. Springer-Verlag.

HRS-BRENKO, M. (1971). The reproductive cycle of the *Mytilus galloprovincialis* Lamk. in the Northern Adriatic Sea and *Mytilus edulis* L. at Long Island Sound. *Thalassia Jugoslavica* **7** (2): 533--542.

IDLER, D.R., KHALIL, M.W., BROOKS, C.J.W., EDMONDS, C.G. and GILBERT, J.D. (1978). Studies of sterols from marine molluscs by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* **59B**: 163-167.

ILLANES-BUCHER, J. and LUBET, P. (1980). Étude le l'activité neurosécrétrice au cours du cycle sexuel annuel de la moule (*Mytilus edulis* L.). Mollusque lamellibranche. *Bull. Soc. Zool. France* **105** (1): 141-145.

JARZEBSKI, A. (1985). Major sterols of bivalve molluscs from the Inner Puck Bay, Southern Baltic. *Comp. Biochem. Physiol.* **81B** (4): 989--991.

JOSEPHS, J.D. (1982). Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca. Progress in lipid research. Pergamon Press.

KAUTSKY, N. (1982). Quantitative studies on gonad cycle, fecundity, reproductive output and recruitment in a Baltic *Mytilus edulis* population. *Mar. Biol.* **68**: 143-160.

KAUTSKY, N. and WALLENTINUS, I. (1980). Nutrient release from a Baltic *Mytilus* - red alga community and its role in benthic and pelagic productivity. *Ophelia* (1): 17-30.

KELLEY, R.N., ASHWOOD-SMITH, M.J. and ELLIS, D.V. (1982). Duration and timing of spermatogenesis in a stock of the mussel *Mytilus californianus*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **62** (3): 509-521.

KENNEDY, V.S. (1976). Reproduction in *Mytilus edulis aoteanus* and *Aulacomya maoriana* (Mollusca: Bivalvia) from Taylors Mistake, New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshwat. Res.* **11** (2): 255-267.

KESSLER, M.J. (1982). A rapid high performance liquid chromatography system for the separation of gonadal steroids. *J. Liq. Chromatogr.* **5** (1): 125-139.

KLUYTMANS, J.H., BOOT, J.H., OUDEJANS, R.C.H.M. and ZANDEE, D.I. (1985). Fatty acid synthesis in relation to gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **81B** (4): 959-963.

KRUSCH, B., SCHOENMAKERS, H.J.N., VOOGT, P.A. and NOLTE, A. (1979). Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of *Helix pomatia* L. (Gastropoda) - an *in vitro* study. *Comp. Biochem. Physiol.* **64B**: 101-104.

KRZYNOWEK, J., WIGGIN, K. and DONAHUE, P. (1983). Sterol and fatty acid content in three groups of surf clams (*Spisula solidissima*): wild clams (60 and 120 mm size) and cultured clams (60 mm size). *Comp. Biochem. Physiol.* **74B** (2): 289-293.

LENGRONNE, C., LE GALL, P., FERAL, C. and LE GALL, S. (1984). Endocrinologie. - Mise au point d'un test biologique *in vitro* permettant de contrôler la présence du facteur mitogène chez *Crepidula fornicata* L. (Mollusque Mésogastéropode). *C. R. Acad. Sc. Paris* (Ser. III) **299** (8): 307-310.

LOWE, D.M., MOORE, M.N. and BAYNE, B.L. (1982). Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **62**: 133-145.

LOWRY, O.H., ROSE BROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-269.

LUBET, P. (1955). Effects de l'ablation des centres nerveux sur l'emission des gamètes chez *Mytilus edulis* L. et *Chalamys varia* L. (Moll. Lamelibranches). *Ann. Sc. Nat. Zool. Biol. Anim.* **2**: 175--183.

LUBET, P. (1957). Cycle sexuel de *Mytilus edulis* L. et de *Mytilus galloprovincialis* LMK. dans le Bassin d'Arcachon (Gironde). *Année Biologique* **33**: 19-29.

LUBET, P. (1959). Recherches sur le cycle sexuel e l'émission de gamètes chez les Mytilides et les Pectinides (Mollusques Bivalves). Revue des Travaux. Institute des Pêches Maritimes 23: 387-548.

LUBET, P. (1966). Essai d'analyse expérimentale des perturbations produites par les ablations de ganglions nerveux chez *Mytilus edulis* L et *Mytilus galloprovinciallis* LMK (Mollusques Lamellibranches). *Ann. Endocr.* **27** (3): 353-365.

LUBET, P. and DE LONGCAMP, L.F. (1969). Etude des variations annuelles des constituants lipidiques chez *Mytilus edulis* (L.) de la Baie de Seine (Calvados). *C.R. Sc. Soc. Biol.* **163**: 1110-1112.

LUBET, P., STREIFF, W., SILBERZAHN, N. and DROSDOWSKY, M. (1973). Endocrinologie de la differenciation sexuelle chez les mollusques prosobranches. *Bol. Zool. Biol. Mar. (S. Paulo)*, **30**: 821-841.

LUBET, P. and MATHIEU, M. (1982). The action of internal factors on gametogenesis in pelecypod molluscs. *Malacologia* **22** (1-2): 131--136.

MANCILLA, J. and GIL, L. (1984). A simple, reliable and rapid HPLC method to separate and quantify androstenedione, testosterone and hydroxy-testosterones. *Analyt. Lett.* **17** (B9): 873-886.

MATHIEU, M., BERGERON, J.P. and DANET, A.M.A. (1982). L'aspartate transcarbamylase, indice d'activité gametogénétique chez la moule *Mytilus edulis* L. *Int. J. Invert. Repr.* **5**: 337-343.

MECHOULAM, R., BRUEGGEMEIER, R.W. and DENLINGER, D.L. (1984). Estrogens in insects. *Experientia* **40**: 942-944.

MYINT, U.M. and TYLER, P.A. (1982). Effects of temperature, nutritive and metal stressors on the reproductive biology of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **67**: 209-223.

NARCHI, W. (1976). Ciclo anual da gametogénese de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca Bivalvia). *Bol. Zool. Univ. S.Paulo* **1**: 331-350.

NES, W.R. (1985). |1| A comparison of methods for the identification of sterols. In *Methods in Enzymology*, Vol. III, pp. 3-37, Academic Press. New York.

NEWELL, R.I.E., HILBISH, T.J., KOEHN, R.K. and NEWELL, C.J. (1982). Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia, Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. *Biol. Bull.* **162**: 299-310.

NEWTON, J.F., BRASELTON, W.E., LEPPER, L.F., MCCORMACK, K.M. and HOOK, J.B. (1982). Rapid separation of testosterone and its microsomal metabolites by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **5** (3): 563-570.

PIETERS, H., KLUYTMANS, J.H., ZANDEE, D.I. and CADÉE, G.C. (1980). Tissue composition and reproduction of *Mytilus edulis* in relation to food availability. *Neth. J. Sea Res.* **14** (3/4): 349-361.

RODHOUSE, P.G., RODEN, C.M., BURNELL, G.M., HENSEY, M.P., MCMAHON, T., OTTWAY, B. and RYAN, T.H. (1984). Food resource, gametogenesis and growth of *Mytilus edulis* on the shore and in suspended culture: Killary Harbour, Ireland. *J. Mar. Biol. U.K.* **64**: 513-529.

SANDOR, T. (1980). Steroids in invertebrates. In *Advances in Invertebrate Reproduction* (Ed. by V.H. Clark, Jr. and T.S. Adams), pp. 81-95, Elsevier North Holland, Inc.

SASTRY, A.N. (1975). Physiology and ecology of reproduction in marine invertebrates. In *Physiological Ecology of Estuarine Organisms* (Ed. by F.J. Vernberg), pp. 279-299. University of South Carolina Press. Columbia.

SASTRY, A.N. (1979). Pelecypoda (excluding Ostreidae). In *Reproduction of marine invertebrates* (Ed. by A.C. Giese and J.S. Pearbe), Vol. 5. Molluscs: Pelecypods and lesser classes, pp. 113-292. Academic Press. New York.

SCHOENMAKERS, H.J.N. (1977). Steroid synthesis of *Asterias rubens*. *Proc. Int. Union Physiol. Sci.* **13**: 673.

SCHOENMAKERS, H.J.N. (1979). *In vitro* biosynthesis of steroids from cholesterol by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.* **63B**: 179-184.

SCHOENMAKERS, H.J.N. (1980). The variation of 3β-hydroxysteroide dehydrogenase activity of the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens* during the annual reproductive cycle. *J. Comp. Physiol.* **138**: 27-30.

SCHOENMAKERS, H.J.N., COLENBRANDER, P.H.J.M. and PEUTE, J. (1977). Ultrastructural evidence for the existence of steroid synthesizing cells in the ovary of the starfish, *Asterias rubens* (Echinodermata). *Cell Tiss. Res.* **182**: 275-279.

SCHOENMAKERS, H.J.N. and VOOGT, P.A. (1980). *In vitro* biosynthesis of steroids from progesterone by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Gen. Comp. Endocr.* **41**: 408-416.

SCHOENMAKERS, H.J.N. and DIELEMAN, S.J. (1981). Progesterone and estrone levels in the ovaries, pyloric caeca, and perivisceral fluid during the annual reproductive cycle of starfish, *Asterias rubens*. *Gen. Comp. Endocr.* **43**: 63-70.

SCHOENMAKERS, H.J.N., VAN BOHEMEN, C.H.G. and DIELEMAN, S.J. (1981a). Effects of oestradiol-17β on ovaries of the starfish *Asterias rubens*. *Dev. Growth Differ.* **23**: 125-135

SCHOENMAKERS, H.J.N. and VOOGT, P.A. (1981). *In vitro* biosynthesis of steroids from androstenedione by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Gen. Comp. Endocr.* **45**: 242-248.

SCHOENMAKERS, H.J.N., GOEDHART, M.J. and VOOGT, P.A. (1984). Biometrical and histological aspects of the reproductive cycle of the ovaries of *Asterias rubens* (Echinodermata). *Biol. Bull.* **166**: 328--348.

SEED, R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. I. Breeding and settlement. *Oecologia* **3**: 277-316.

SEED, R. (1975). Reproduction in *Mytilus* (MOLLUSCA:BIVALVIA) in European waters. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, **39** (1): 317-334.

SEED, R. and BROWN, R.A. (1978). Growth as a strategy for survival in two marine bivalves, *Cerastoderma edule* and *Modiolus modiolus*. *J. Anim. Ecol.*. **47**: 283-292.

SICA, D. (1980). Sterols from some molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* **65B**: 407-410.

SUGIURA, Y. (1959). Seasonal change in sexual maturity and sexuality of *Mytilus edulis*. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.* **25** (I): 1-6.

TESHIMA, S. and KANAZAWA, A. (1972). Comparative study on the sterol composition of marine mollusks. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.* **38** (11): 1299-1304.

TESHIMA, S. and KANAZAWA, A. (1973). Biosynthesis of sterols from desmosterol in a mussel, *Mytilus edulis*. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.* **39** (12): 1309-1314.

TESHIMA, S. and KANAZAWA, A. (1974). Biosynthesis of sterols in abalone, *Haliotis gurneri*, and mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **47B**: 555-561.

VAN DER PLAS, A.J. and OUDEJANS, R.C.H.M. (1982). Changes in the activities of selected enzymes of intermediary metabolism in the pyloric caeca and ovaries of *Asterias rubens* during the annual reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* **71B** (3): 379-385.

VOOGT, P.A. (1973). On the biosynthesis and composition of 3β-sterols in some representatives of the Asteroidea. *Int. J. Biochem.* **4**: 42--50.

VOOGT, P.A. (1973). Investigations of the capacity of synthesizing 3β--sterols in mollusca. X - Biosynthesis and composition of 3β--sterols in Cephalopoda. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **81**: 401-407.

VOOGT, P.A. (1975). Investigations of the capacity of synthesizing 3β--sterols in mollusca - XIII. Biosynthesis and composition of sterols in some bivalve (Anisomyaria). *Comp. Biochem. Physiol.* **50B**: 499-504.

VOOGT, P.A. (1975). Investigations of the capacity of synthesizing 3β--sterols in mollusca - XIV. Biosynthesis and composition of sterols in some bivalves (Eulamellibranchia). *Comp. Biochem. Physiol.* **50B**: 505-510.

VOOGT, P.A. and DIELEMAN, S.J. (1984). Progesterone and oestrone levels in the gonads and pyloric caeca of the male sea star *Asterias rubens*: a comparison with the corresponding levels in the female sea star. *Comp. Biochem. Physiol.* **79A** (4): 635-639.

WALTON, M.J. and PENNOCK, J.F. (1972). Some studies on the biosynthesis of ubiquinone, isoprenoid alcohols, squalene and sterols by marine invertebrates. *Biochem. J.* **127**: 471-479.

WIJDENES, J. and RUNHAM, N.W. (1976). Studies on the function of the dorsal bodies of *Agriolimax reticulatus* (Mollusca; Pulmonata). *Gen. Comp. Endocr.* **29**: 545-551.

WILSON, B.R. and HODGKIN, E.P. (1967). A comparative account of the reproductive cycles of five species of marine mussels (Bivalvia: Mytilidae) in the vicinity of Fremantle, Western Australia. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* **18**: 175-203.

YAKOVLEV, Y.M. (1979). Reproductive cycle of the Pacific oyster in the sea of Japan. *Biologiya Moria* **3**: 85-87.

YAMADA, K. and AIZAWA, Y. (1983). A simple method for testosterone measurement by high-performance liquid chromatography - UV sepectrophotometer. *J. Pharmacol. Meth.* **10**: 167-173.

ZANDEE, D.I., KLUYTMANS, J.H., ZURBURG, W. and PIETERS, H. (1980). Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Neth. J. Sea Res.* **14** (1): 1-29.

CAPÍTULO III

INTRODUÇÃO

O envolvimento do sistema nervoso endócrino nos processos osmorreguladores é, de um modo geral, assumido. Estudos fisiológicos detalhados relacionados com a regulação do conteúdo de água e de iões foram conduzidos em algumas espécies de moluscos. Nestes animais a extirpação de certos gânglios do sistema nervoso central (S.N.C.) provocava uma tumefacção do corpo, enquanto a reimplantação ou a injecção de homogeneizados desses gânglios resultava num decréscimo do peso do corpo, sendo estas variações dependentes de um factor diurético existente nesses gânglios (Nagabhushanam, 1964).

O caracol de água doce, *Lymnaea stagnalis*, foi o molusco mais estudado neste campo, possivelmente pelo conhecimento detalhado das estruturas do seu sistema nervoso. Joosse (1964) e Wendelaar Bonga (1970) debruçaram-se sobre os aspectos histoquímicos e ultra-estruturais do sistema nervoso desta espécie, a que se seguiram os estudos relacionados com a fisiologia da osmorregulação (p.e. Van Aardt, 1968). Chaisemartin (1968) estabeleceu que os gânglios pleurais controlavam o débito urinário, enquanto que os gânglios parietais libertavam um factor hormonal que controlava os movimentos do sódio a nível do tegumento, em *Lymnaea stagnalis*.

Neste molusco os gânglios pleurais, viscerais e pedálicos contêm um grupo de células fucsinófilas que coram de verde escuro com o azul Alcian/amarelo Alcian (dark green cells - DGC), e que estão envolvidas no processo de osmorregulação (Wendelaar Bonga, 1971). As DGC possuem terminações nervosas que se estendem até ao manto, pé e pele (Swindale e Benjamim, 1976). Devido à distribuição das terminações axónicas, estes autores sugeriram que a regulação osmótica poderia ser feita pelo ajustamento da permeabilidade do tegumento e pelo transporte activo dos iões, mais do que pela regulação da diurese, embora estes sejam mecanismos complementares. Entendiam ainda que a neurossecreção periférica poderia controlar o transporte activo de iões no manto bem como a secreção da glândula do muco, que desempenhariam também uma acção na osmorregulação.

Os moluscos de água doce, como a *L. stagnalis*, mantêm um elevado gradiente osmótico entre o sangue e o meio ambiente. Este gradiente provoca um fluxo de água para o interior do animal, e uma difusão de solutos em sentido contrário. O mecanismo para a manutenção de um estado de equilíbrio envolve geralmente a produção de grandes quantidades de urina hipotónica e um transporte activo de iões (Van Aardt, 1968).

Wendelaar Bonga (1971b e 1972) focou os seus estudos nas células existentes em ambos os gânglios pleurais, as DGC, e constatou que estas células eram activadas quando o animal era colocado em água desionizada, dando-se um aumento significativo na extensão do retículo endoplasmático granular e na actividade do complexo de Golgi. A exposição a uma solução salina (NaCl 0,1 M) suprimiria o processo secretor, provocando uma regressão citoplasmática geral. Um outro tipo de células neurossecretoras, as células amarelas (yellow cells - YC), localizadas nos gânglios parietais e viscerais, estariam envolvidas nos mecanismos de transporte de iões localizados nas membranas do corpo e ureter.

Embora hipotónica em relação ao sangue, a urina dos animais de água doce é altamente hipertónica em relação ao meio, sendo nesta situação a perda de iões um problema importante. Em *L. stagnalis* as perdas são compensadas pelo transporte activo de iões, possivelmente pelo tegumento (Greenaway, 1970, 1971), pelo ureter (Van Aardt, 1968) e até pelo tubo gastrintestinal. A ocorrência de mecanismos de transporte de Na^+ e Cl^- está largamente espalhada nos animais de água doce (Kirschner, 1970) e em *L. stagnalis*; além destes mecanismos haveria, segundo Greenaway (1971), um mecanismo de transporte independente para o Ca^{2+}.

Também em duas espécies de caracóis pulmonados, *Helisoma duryi* e *H. trivolvis*, Khan e Saleudin (1978) estabeleceram a relação entre a neurossecreção das células do SNC e a regulação osmótica. Submetendo os animais a variações osmóticas entre 0,5 e 200 mOsm/l (osmolaridade normal da hemolinfa 115 mOsm/l), detectaram nos gânglios parietais dois tipos de células 1 e 2, com características de coloração fucsina-paraldeído positivas (FPA), que segregavam um factor envolvido na diurese, e as células do tipo 3, FPA negativas, localizadas nos gân-

glios viscerais responsáveis pela segregação de um factor antidiurético. Mas a actividade das células neurossecretoras (CNS) parece manter uma relação estreita com a actividade reprodutora destes animais. Lubet (1956) verificou que nos bivalves a emissão dos gâmetas estava dependente de factores externos e internos. O período de eficácia máxima dos estímulos externos correspondia a um período de evacuação dos produtos de neurossecreção das CNS dos gânglios cerebróides e viscerais. A acumulação do produto de secreção era máximo no momento da maturação gametogénica. Varaksin (1978) descreveu inclusões Gomori positivas (de cor amarelo dourado) nos gânglios cerebropleurais, viscerais e pedálicos de dois bivalves. Verificou este autor que as células que continham o material Gomori positivo não apresentavam a mesma estrutura nem as mesmas propriedades de coloração ao longo do ano, o que lhe permitiu estabelecer uma correlação positiva entre a actividade secretora e a actividade sexual. A quantidade destas inclusões nos axónios antes da emissão dos gâmetas era bastante elevada. Embora os grânulos peptídicos nos invertebrados possam desempenhar uma função sináptica, seria contudo difícil de aceitar tão elevada densidade de grânulos somente para o processo de mediação. Aparentemente eles desempenhariam uma função hormonal.

Usando colorações sinalépticas, entre as quais a hematoxilina-chumbo e a fucsina paraldeído, Illanes-Bucher e Lubet (1980) puseram em evidência em *Mytilus edulis*, quatro tipos de células neurossecretoras, a_1, a_2, a_3 e a_4. Os gânglios cerebróides continham cerca de 75% destas células, sendo as do tipo a_1 as mais numerosas. A sua actividade no decurso do ciclo reprodutivo anual seguia de maneira significativa a evolução da gametogénese, precedendo o aparecimento das mitoses da gónada. Lubet e Mathieu (1982) estenderam este estudo a outros moluscos pelecípodes, como *Cassostrea gigas* e *Ostrea edulis*, e concluiram que o desenvolvimento da gametogénese durante o ciclo reprodutivo anual dependia da acção de factores neuroendócrinos emitidos pelos gânglios cerebropleurais: um **factor mitótico**, um **factor meiótico**, um **factor pré-vitelogénico** e um **factor vitelogénico**.

Em *Aplysia californica* foram também identificados dois tipos de células neurossecretoras localizadas nos gânglios abdominais

(Kupfermann, 1967) que segregavam uma substância estimuladora da libertação dos ovos.

Mas para além da acção destes produtos de neurossecreção na regulação osmótica e na reprodução, também a sua caracterização química foi levada a cabo por diversos autores.

O SNC e os orgãos periféricos enervados de *Mytilus edulis*, *Anodonta cygnea* e de outros invertebrados contêm as monoaminas: serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina), dopamina (DA) e norepinefrina (NE) (Stefano a Aiello, 1975; Stefano et al. 1976; Stefano e Catapane, 1977a).

Estes compostos desempenhavam funções de agentes neurotransmissores, central e periféricos envolvidos em funções fisiológicas como a actividade ciliar, actividade adutora, actividade do músculo retractor do bissus e actividade cardíaca. Os neurónios do SNC dos moluscos contêm predominantemente 5-HT ou DA.

Stefano et al. (1976) após o tratamento de *Mytilus edulis* com drogas precursoras destas aminas, verificaram que a concentração de 5--HT parecia ser determinada em parte pela concentração de DA. Segundo Stefano e Aiello (1975) poderiam ocorrer nos moluscos variações sazonais no conteúdo destas aminas. Stefano e Catapane (1977) dosearam em *Mytilus edulis* os níveis da 5-HT, da DA e da NE ao longo do ano e verificaram existirem variações sazonais no conteúdo destas monoaminas do SNC, sendo os níveis altos no Verão e baixos no Inverno. Estes trabalhos, envolvendo o metabolismo das monoaminas previam que estas variações poderiam influenciar a sensibilidade dos organismos perante os agentes endógenos e exógenos, desempenhando um papel importante no padrão do comportamento destes animais.

Tendo em vista a importância do sistema monoaminérgico na fisiologia dos animais, e neste caso dos moluscos, e o facto dos ectotérmicos não manterem constante a temperatura do corpo, Stefano et al. (1977) correlacionaram as variações de temperatura ambiente e o stress com o metabolismo das monoaminas em *Mytilus* e *Anodonta*, medindo as variações nas concentrações da 5-HT, DA e NE quando submetidos a variações de temperatura. Verificaram que o nível da 5-HT aumentava com a subida de

temperatura, enquanto o frio o diminuia. As catecolaminas mostravam uma variação cíclica para ambas as situações.

Estes resultados mostraram que, tal como para os mamíferos, o metabolismo das monoaminas nos bivalves era alterado durante o processo de aclimatação da temperatura (Spafford e Pongelly, 1971).

Após a administração de 5-HT em *Mytilus*, Stefano e Aiello (1978) localizaram a distribuição desta amina nos tecidos, com o objectivo de definir quais as estruturas mais selectivas para a actuação da droga. Assim a injecção intracardíaca da amina provocava uma distribuição rápida da 5-HT pelos gânglios do SNC, enquanto a aplicação tópica num gânglio fazia com que a amina se localizasse essencialmente nessa estrutura. A presença de NE no SNC de *Mytilus edulis* foi posteriormente confirmada por Stefano e Catapane (1980) por métodos mais específicos, como o método radioenzimático e o espectrofluorométrico. Para Burrel e Stefano (1981) os gânglios viscerais estariam mais directamente envolvidos nos reflexos motores, isto é, com a brânquia e a regulação adutora, enquanto os gânglios cerebrais estariam envolvidos na regulação e integração da actividade motora com outras actividades do organismo.

Leung e Stefano (1984) isolaram e identificaram um sistema encefalinérgico no gânglio pedálico de *Mytilus edulis*, similar ao encontrado nos organismos superiores. Para Stefano et al. (1980) os níveis das encefalinas nestes animais estariam sujeitos a variações sazonais.

As variações na concentração intracelular de cálcio provocam, segundo Meech (1972), alterações na permeabilidade das membranas. Em invertebrados, e mais concretamente em *Mytilus edulis*, Paparo (1980) examinou o papel do Ca^{2+} na libertação dos neurotransmissores do SNC, estabelecendo para este ião um papel na regulação da libertação de NE e DA nas terminações pré-sinápticas do nervo.

Nos gânglios cerebrais Joosse (1969) caracterizou a presença de três tipos distintos de células: as células verde claro (light green cells - LGC), as células caudodorsais (caudodorsal cells - CDC) e as células verde brilhante (bright green cells - BGC). Ligados aos gânglios encontravam-se os corpos dorsais (dorsal bodies - DB), que mantinham uma relação estreita com as LGC. Estes corpos produziam a hormona

do corpo dorsal (DBH) com interferência na função reprodutora feminina (Geraerts e Algera, 1972 e Geraerts e Joosse, 1975).

Experiências de extirpação e reimplantação dos gânglios e de cauterização de um determinado grupo de células, levaram Joosse e Geraerts (1969) e Geraerts (1975) a atribuir às LGC e DB um envolvimento no controlo do crescimento. A hormona do crescimento segregada pelas LGC tinha, segundo estes autores, um efeito directo sobre o crescimento de todos os tecidos do corpo e ainda um efeito indirecto na alimentação e reprodução.

As LGC desempenhavam uma acção fundamental para a formação da concha. Estudos feitos em *Lymnaea stagnalis* por Dogteron et al. (1979) provaram que estas células actuavam na periferia do manto estimulando a manutenção de uma concentração elevada de cálcio neste tecido, e ainda a deposição de cálcio na camada cristalina da concha. Dogteron e Van der Schors (1980), também em *L. stagnalis*, verificaram que após a remoção das LGC a concentração de bicarbonato na hemolinfa tinha uma descida de cerca de 20-30%, o que foi atribuído principalmente a uma diminuição da actividade metabólica.

Em *Helisoma* certas células neurossecretoras dos gânglios viscerais têm sido implicados na regeneração da concha (Dillaman et al., 1976).

Para avaliar o papel de alguns esteróides na formação do exoesqueleto do molusco aquático *Bionphalaria glabrata*, Whitehead (1971) injectou $^{45}CaCl_2$ através da concha, só e em associação com esteróides ou seus derivados (colesterol, estigmasterol, vitamina D, ecdisonas), e constatou que o composto que apresentava uma acção mais marcada em relação à deposição do cálcio era a ecdisterona.

Whitehead e Saleudin (1978) seguiram também a incorporação de $^{45}Ca^{2+}$ na concha do molusco pulmonado *Helix aspersa*. Injectando o composto marcado no tentáculo óptico destes animais verificaram que este era progressivamente incorporado, quer na concha em regeneração quer na concha intacta. A ecdisterona diminuia a incorporação do radioisótopo na concha intacta, mas aumentava a sua fixação pela concha em regeneração. Concluindo, estes autores puseram a hipótese de que, quer o colesterol quer a ecdisterona, poderiam acelerar a regeneração

da concha em *Helix* (com uma alimentação desprovida de esteróides), por imitarem a acção de um factor que estaria presente na concha lesada, em condições normais, factor esse que seria distinto da hormona do crescimento caracterizada em *L. stagnalis* (Geraerts, 1976) e do factor que elevava os níveis de Ca^{2+} na hemolinfa de *Helix pomatia* (Burton, 1977).

É ainda sabido que os esteróides aumentam a permeabilidade dos tecidos por interacção com as membranas celulares (p.e. Szabo, 1974).

Estabelecendo as relações entre os diversos factores produzidos pelo sistema nervoso dos moluscos e a evolução do ciclo reprodutivo, conhecido o efeito de factores igualmente produzidos no sistema nervoso e os fenómenos de regulação da permeabilidade dos epitélios de revestimento destes animais (e dos mecanismos de transporte transmembranar), e verificada a acção de algumas hormonas esteróides sobre a reparação da concha em lamelibrânquios (o que implicará uma acção sobre os movimentos de cálcio), seria interessante estudar a correlação entre as variações cíclicas da permeabilidade dos epitélios ao longo do ano e a evolução do ciclo reprodutivo em *Mytilus*.

MATERIAIS E METODOS

Neste capítulo apresentaremos os resultados de cinética isotópica para o sódio e o manitol, a fim de definir o estado dinâmico das trocas iónicas no manto.

Os estudos da permeabilidade foram efectuados em mexilhões das colheitas feitas entre Dezembro de 1982 a Novembro de 1983. Foi estudado o transporte de sódio e manitol através do manto, da cavidade paleal para o líquido extrapaleal.

Depois dos animais abertos, os dois mantos, cada um correspondendo a uma valva, foram separadas do resto do corpo. O manto representa um tecido de vital importância não só para a regulação iónica como para a reprodução deste animal. Como tal a sua constituição é bastante complexa, apresentando o aspecto de um folheto cuja espessura varia conforme a época do ano, e que é limitado nas duas extremidades por duas camadas unicelulares de células epiteliais; estas delimitam um tecido complexo que apresenta uma variação notável de três tipos de células: as células do tecido adipo granular, as células vesiculares e os gâmetas, cada um com uma ocorrência sazonal. Na parte intersticial circula a hemolinfa do animal.

Só a parte central do manto foi utilizada para as medições de permeabilidade.

A - ESTUDO CINETICO DOS MOVIMENTOS DE SÓDIO E MANITOL

Cada fragmento do manto foi fixado entre duas câmaras, segundo um esquema clássico para o estudo *in vitro* do transporte de iões através dos espitélios. Cada uma das câmaras delimitada pelo tecido foi cheia com uma solução salina que permitiu manter o tecido vivo. Esta solução foi agitada e arejada de uma maneira contínua com carbogénio (95% de O_2 e 5% de CO_2).

Como as espécies marinhas, nas quais se inclui o *Mytilus*, são isosmóticas em relação à água do mar, a composição iónica da hemolinfa difere pouco da do meio na qual vivem. Assim a solução salina usada foi a água salgada artificial cuja composição está descrita no quadro 1.

QUADRO 1 - Composição da água salgada artificial (ASA)

$NaCl$	$CaCl_2$	$MgSO_4, 7H_2O$	$MgCl_2$	KCl	$Na_2HPO_4, 2H_2O$
500	10	30	20	10	1
Valores expressos em mmoles/l. Foi adicionado 1 g de glucose por cada litro de água.					

A montagem dos mantos fez-se segundo o esquema de Ussing (Fig. 1). O volume das soluções nas duas câmaras foi de 3,5 ml. Nos fluxos unidireccionais a quantidade de sódio-22 adicionado à câmara correspondente à cavidade paleal foi de 3 µCi e a de D $|1\text{-}^{14}C|$ manitol de 2 µCi. As experiências foram efectuadas à temperatura ambiente.

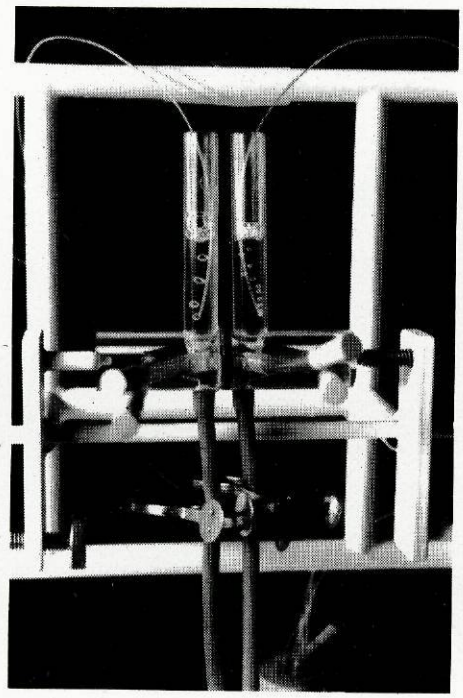


Fig. 1 - Esquema de Ussing. Montagem experimental utilizada para a medida dos fluxos radioactivos. O tecido (manto) separa as duas câmaras cheias de ASA e continuamente arejadas.

O sódio-22 e o D $|1\text{-}^{14}C|$ manitol foram obtidos no Radiochemical Centre. Amersham. Inglaterra.

As alíquotas das soluções foram dissolvidas no líquido de Bray e a radioactividade medida num analisador de cintilação líquida PHILIPS PW 4540 equipado com Padrão Externo para a correcção do "quench".

Composição do Líquido de Bray:

naftaleno 60 g; etilenoglicol 20 ml; metanol 100 ml; PPO 4 g; POPOP 0,2 g e dioxano até perfazer 1 000 ml.

Apresentaremos em seguida algumas definições fundamentais para uma melhor compreensão dos movimentos dos iões através de membranas:

O termo **compartimento**, para além do seu sentido normal é definido como um conjunto de iões ou de moléculas, de uma determinada espécie, apresentando a mesma probabilidade de sofrer um dado acontecimento, por exemplo de deixar o compartimento ou de tomar parte numa reacção química.

Um sistema de vários compartimentos atingirá o **estado estacionário** quando o número de iões ou moléculas que deixam os compartimentos for compensada a cada instante pelos movimentos em sentido contrário.

Aos **movimentos unidireccionais** de iões chamamos **fluxos.** Um fluxo líquido será a diferença entre o que entra e o que sai de um dado compartimento. Pode ser positivo, negativo ou nulo.

1 - MEDIDA DOS FLUXOS UNIDIRECCIONAIS

Só os elementos enriquecidos com um dos isótopos estáveis, utilizados como marcadores, permitem estudar as trocas iónicas. Se não existe "efeito isotópico" num sistema no estado estacionário, as transferências do elemento estável seguem as mesmas leis do elemento radioactivo.

O elemento do qual se quer estudar a cinética de transferência através do manto é marcado na solução salina de uma das câmaras por meio do seu radioisótopo. O aparecimento do radioelemento é seguido em função do tempo na segunda câmara.

A curva da figura 2 mostra a acumulação do radiosódio na câmara que corresponde ao líquido extrapaleal, tendo sido marcado no tempo zero com ^{22}Na colocado na câmara correspondente à cavidade paleal. Este tipo de experiência permite uma estimativa da importância dos fluxos unidireccionais de sódio.

Quanto à acumulação do manitol na câmara correspondente ao líquido extrapaleal, tendo também sido marcado no tempo zero com ^{14}C-manitol colocado na câmara correspondente à cavidade paleal (Fig. 3), verifica-se que a linearidade da curva só é atingida a partir das 3h 30min, devido ao tempo de renovação do compartimento ser mais lento, sendo os cálculos feitos a partir destes valores da recta.

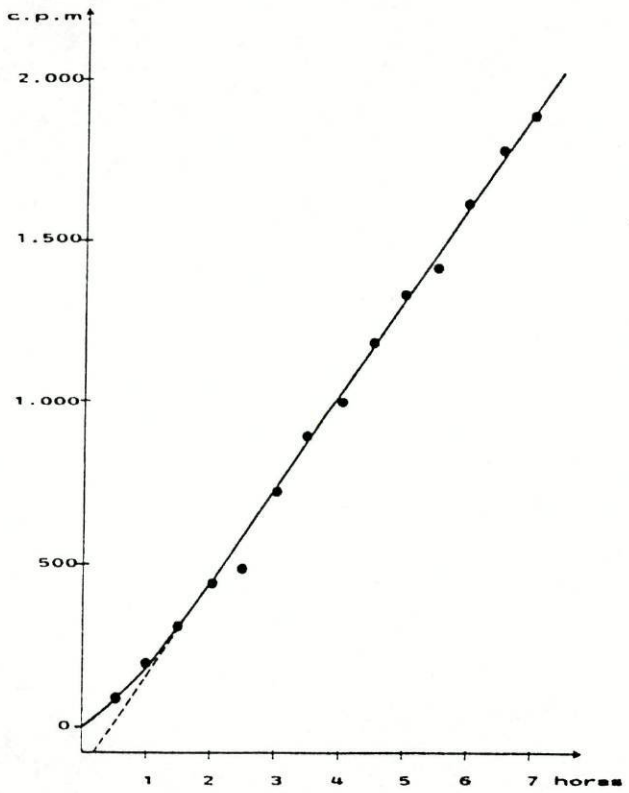


FIG. 2 - Curva cumulativa do aparecimento do sódio marcado na câmara correspondente à cavidade extrapaleal.
Concentração de sódio no meio - 502 mEq/l
Superfície do manto - 1,54 cm^2

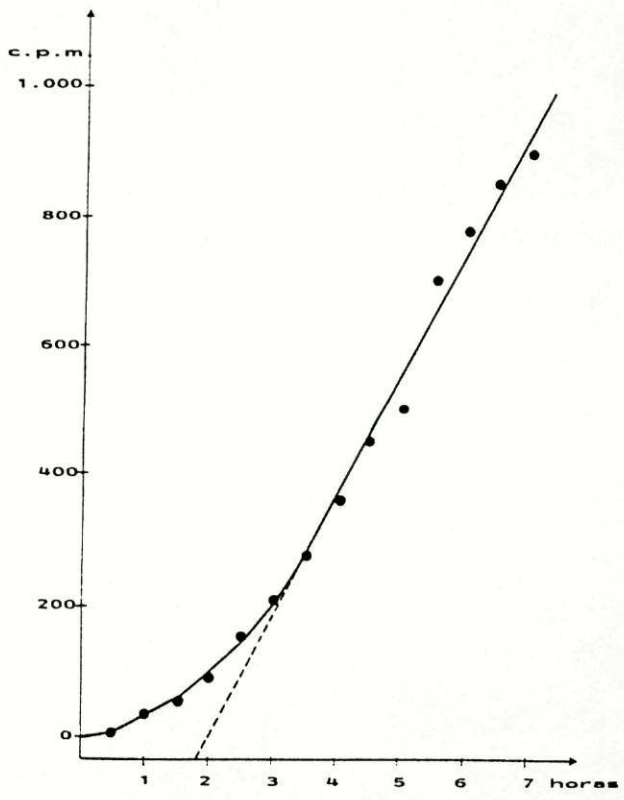


FIG. 3 - Curva cumulativa do aparecimento do manitol marcado na câmara correspondente à cavidade extrapaleal.
Concentração de manitol no meio - 10,4 µmoles/l
Superfície do manto - 1,54 cm^2

Duas considerações se impoêm ao observar estas curvas:

- A primeira é a sua linearidade a partir de 1h (sódio) e 3h 30min (manitol) após o início da experiência. Com efeito, como foi assinalado, esta parte da curva corresponde ao início de uma função exponencial e pode ser assimilada a uma recta.

- A segunda é que a recta extrapolada não passa exactamente pela origem dos eixos. Este fenómeno é geralmente devido à "carga" de um compartimento intermédio (Istin, 1964) que é, porém, de pequena amplitude nesta experiência.

O estudo matemático das trocas iónicas num sistema biológico tem sido objecto de vários estudos, podendo salientar-se entre outros os conduzidos por Motais e Maetz (1964) e Coimbra (1972).

As trocas entre os dois compartimentos são representadas por funções exponenciais simples. O começo da curva de aparecimento do radioelemento num compartimento pode ser então representada por uma recta. Durante este período de tempo o cálculo dos fluxos encontra-se consideravelmente simplificado se for possível aplicar as seguintes hipóteses:

- Que o fluxo do elemento marcado que sai é desprezável em relação ao fluxo que entra no compartimento; o que acontece habitualmente.
- Que o sistema possa ser tomado como um sistema no estado estacionário durante a experiência.

O fluxo entrando será, nas condições acima descritas, calculado pela aplicação da seguinte fórmula:

$$fe = \frac{\Delta Q / \Delta t}{R.A.E.}$$

$\Delta Q/\Delta t$ - variação por unidade de tempo da radioactividade no compartimento (2)

R.A.E. - radioactividade específica do elemento estudado no compartimento (1)

fe - fluxo do compartimento (1) para o compartimento (2) do elemento estudado.

No entanto o tecido não representa sempre uma barreira simples. Ele comporta-se normalmente como um compartimento intermediário limitado por duas barreiras que podem opor-se ao movimento dos iões.

Cada um dos epitélios representa uma barreira que separa os dois compartimentos (1 e 3) (Fig. 4).

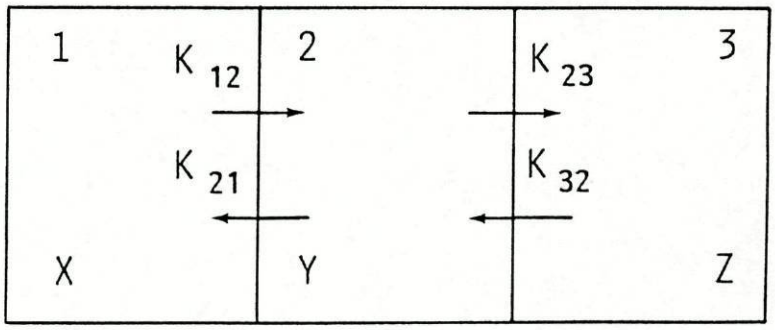


FIG. 4 - Esquema teórico de um sistema de três compartimentos:
1 - cavidade paleal
2 - manto
3 - cavidade extrapaleal
Os K_{ij} representam os coeficientes de transporte de um ião do compartimento **i** para o compartimento **j**
X, Y e **Z** representam as quantidades do radioelemento presente em cada instante nos compartimentos 1, 2 e 3

A montagem experimental já descrita pode ser comparada a um sistema a três compartimentos.

A importância relativa deste compartimento intermediário pode ser calculada pela curva de aparecimento do elemento marcado na câmara. Com efeito esta curva só se torna linear depois de um certo intervalo, dependendo do tamanho do compartimento intermediário. Contudo, o tamanho e as suas características são determinadas em melhores condições pelas experiências de descarga.

2 - MEDIDA DOS FLUXOS DE DESCARGA ("WASH-OUT")

É igualmente possível marcar o compartimento intermediário por um contacto prévio e prolongado do manto com o indicador radioactivo. O aparecimento do radioelemento nos compartimentos 1 e 3 é assim seguido em função do tempo. Experimentalmente esta descarga foi realizada por uma renovação contínua das soluções que se encontravam em contacto com as duas faces externas do manto, por outras soluções frias.

As três equações que representam as trocas de um tal sistema de três compartimentos em série (Fig. 4) são:

$$\frac{dx}{dt} = K_{21}y - K_{12}x$$

$$\frac{dy}{dt} = K_{12}x - K_{21}y - K_{23}y + K_{32}z$$

$$\frac{dz}{dt} = K_{23}y - K_{32}z$$

Cada uma destas equações representa a diferença entre a quantidade do elemento radioactivo que entra e a que sai de cada compartimento.

O manto foi montado numa câmara de Ussing, de acordo com a figura 1, tal como para a medição dos fluxos unidireccionais. A solução radioactiva foi introduzida nas duas câmaras na concentração de 16,5 µCi (para o ^{45}Ca), de 1,5 µCi (para o ^{14}C-manitol) ou de 1,87 µCi (para o ^{22}Na) . Após um período de incubação suficientemente longo o elemento contido no tecido, e do qual se queria estudar as trocas, encontrava-se marcado. As soluções foram então substituídas nas duas câmaras no tempo zero por soluções de composição idêntica, mas sem marcador radioactivo. Estas soluções foram renovadas de maneira contínua e com um débito suficiente. Isto permitia comparar as duas câmaras a um compartimento de tamanho infinito. Com esta condição experimental, os fluxos de retorno radioactivo para o tecido eram desprezáveis.

A radioactividade que aparece em cada uma das câmaras é então seguida em função do tempo. A evolução desta curva de radioactividade pelo tecido fornece numerosas informações sobre o estado dinâmico do elemento estudado no tecido.

Portanto, a equação que traduz as variações da quantidade de marcador presente em função do tempo no compartimento (2) ficará reduzida a:

$$\frac{dy}{dt} = - (K_{21} + K_{23})\, y$$

que representa a totalidade do elemento que sai do compartimento por unidade de tempo.

A equação (2) dá:

$$y = y_o\, e^{- (K_{21} + K_{23})\, t} \qquad (3)$$

Podemos, a partir desta equação, calcular:

$$z = K_{23}\, y_o\, e^{- (K_{21} + K_{23})\, t} \qquad (4)$$

e

$$x = K_{21}\, y_o\, e^{- (K_{21} + K_{23})\, t} \qquad (5)$$

Em coordenadas semilogarítmicas estas equações são representadas por duas rectas paralelas de inclinação $(K_{21} + K_{23})$. O coeficiente $(K_{21} + K_{23})$ tem um significado biológico: é a constante de renovação do compartimento, quer dizer, a fracção de y_o renovada por unidade de tempo. Esta constante permite o cálculo do período biológico do elemento estudado, que corresponde ao tempo ao fim do qual 69 % do compartimento terão sido renovados num sistema no estado estacionário. A equação que relaciona a constante de renovação $K = (K_{21} + K_{23})$ e o período T é:

$$T = \frac{0{,}69}{(K_{21} + K_{23})} \qquad (6)$$

A relação das equações (4) e (5) mostra que:

$$\frac{x}{z} = \frac{K_{21}}{K_{23}}$$

Esta equação representa a relação das permeabilidades das duas barreiras para o ião estudado.

3 - CÁLCULO DO TAMANHO DOS COMPARTIMENTOS

Se se admite que o período de incubação na solução radioactiva para a carga dos compartimentos intermediários é suficientemente longo em relação às suas velocidades de renovação, é permitido pensar que elas atinjam o mesmo equilíbrio isotópico que as soluções que os banham.

É suficiente nestas condições determinar para cada compartimento, a partir das curvas de descarga, a radioactividade total do tecido no tempo zero (começo da experiência de descarga), e de a dividir pela radioactividade específica das soluções de carga para conhecer o tamanho do compartimento. Graficamente obtém-se, por extrapolação no tempo zero das rectas representando o esvaziamento do compartimento, os valores x_o e z_o.

O tamanho do compartimento (y_o) será calculado a partir das equações (4) e (5) para t=0

$$y_o = \frac{x_o + z_o}{(K_{21} + K_{23})} \qquad (8)$$

B - DOSEAMENTO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA (E.A.A.)

1 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

De cada uma das colheitas efectuadas de Dezembro de 1982 a Novembro de 1983 foram retirados 6 animais (3 machos e 3 fêmeas) onde foram determinados o sódio, o potássio e o cálcio.

Foi utilizado o "método da calcinação seca" (ver Standard Methods). Assim começou-se por liofilizar as amostras, sendo os liofilizados obtidos calcinados numa mufla a 450 °C, durante 22 horas (até à obtenção de uma cinza branca). Das cinzas totais foram retiradas alíquotas de cerca de 0,3 g que foram sujeitas a uma digestão com ácido azótico concentrado, a quente. As soluções resultantes foram filtradas, perfazendo-se depois o volume de 25 ml com água acidulada (1,5 ml de HNO_3 para 1 000 ml de água destilada).

2 - DOSEAMENTO DOS IÕES

Os três iões foram medidos num espectrofotómetro de absorção atómica VARIAN 175, sendo o cálcio doseado por absorção e o sódio e o potássio por emissão.

Os padrões de cálcio situaram-se numa gama de 1 a 8 µg/ml, feitos a partir de uma solução-mãe diluída com água acidulada.

Para o sódio, a gama de padrões feitos a partir de uma solução-mãe, e diluída com uma solução de KCl a 2 000 µg/ml, foi de 0,2 a 1,2 µg/ml.

Os padrões de potássio foram de 1 a 5 µg/ml, feitos também a partir de uma solução-mãe, e diluídos com uma solução de CsCl a 1 000 µg/ml.

C - MEDIDA DO GRAU DE HIDRATAÇÃO DOS TECIDOS

O grau de hidratação dos tecidos do animal inteiro foi obtido por liofilização, como foi descrito nos capítulos anteriores. Nos fragmentos dos mantos usados na determinação dos fluxos unidireccionais de "wash-out", o grau de humidade foi obtido por aquecimento numa estufa a 80 °C, até peso constante.

D - MEDIDA DAS DIFERENÇAS DE POTENCIAL

As medidas da diferença de potencial, DP, foram conduzidas em cada metade do manto, depois da separação destas da massa do corpo e tão próximo possível da borda da concha.

O tecido foi fixado entre duas câmaras (Fig. 5), cada uma das quais foi cheia com ASA.

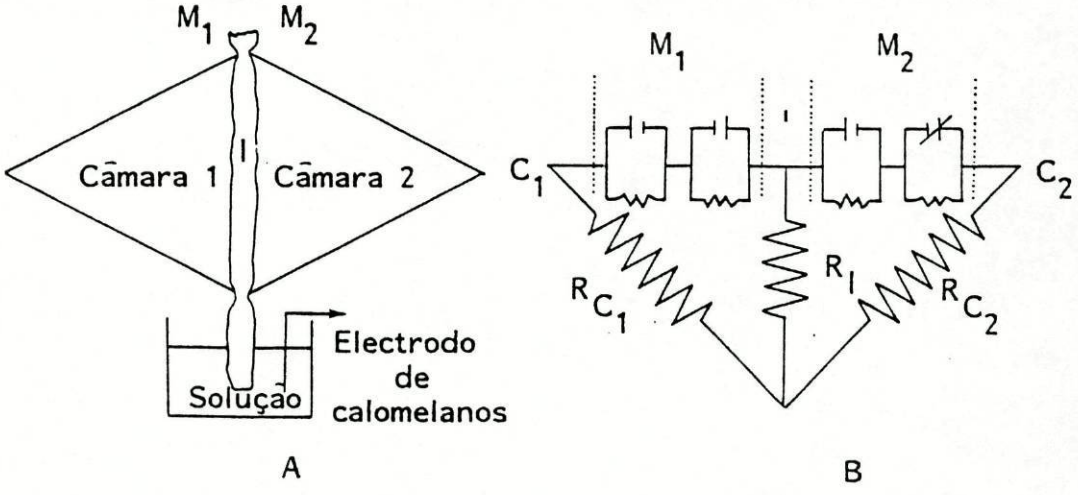


FIG. 5 - Uso do sistema com três eléctrodos. (**A**) Esquema de ligação do tecido ao eléctrodo "comum". Os dois outros eléctrodos estão em contacto com soluções das câmaras, por meio de pontes. Nas experiências dos mantos inteiros, M_1 e M_2 representam a cavidade paleal e a cavidade extrapaleal, e I a região intersticial. (**B**) Circuito equivalente do manto intacto e do eléctrodo comum. M_1 e M_2 são os epitélios do lado da cavidade e do lado da concha, e I o interstício, como na figura A. Os dois outros eléctrodos estão em ligação com as câmaras 1 e 2.

Algumas das medidas de potencial foram feitas com um sistema a 3 eléctrodos, previamente usado na pele da rã (Steinbach, 1933; Janácek,

1962). As pontes de agar colocadas em cada uma das soluções que banham a preparação foram ligadas a um potenciómetro RADIOMETER PHM 64 através de eléctrodos de calomelanos de fabrico caseiro. Uma tira do manto situada abaixo das câmaras foi mergulhada na mesma solução salina e também ligada a um potenciómetro através de um eléctrodo de calomelanos. Um sistema de três interruptores permite as medidas das DP entre cada par de eléctrodos. Os dois eléctrodos em contacto com as duas soluções medem as DP através do manto. Isto é calculado em duas etapas (chamadas diferenças de potencial parciais ou DPP's) entre cada solução e o eléctrodo do tecido.

Um destes potenciais para a câmara 1 é medido através de um filme de líquido que adere a M_1; um segundo é medido através do correspondente filme M_2 para a câmara 2, enquanto que um terceiro é medido através do corte do tecido na região entre M_1 e M_2. Um circuito equivalente está representado na figura 5A.

É evidente que as resistências através dos filmes dos líquidos externos (Rc_1 e Rc_2) são muito mais altas que através do tecido (R_1), e a DPP entre os eléctrodos inferior e cada um dos banhos é a alteração de potencial através de M.

Neste sistema usado nos mantos, M_1 e M_2 representam as membranas epiteliais do lado da cavidade e do lado da concha.

Este sistema de eléctrodo promove a entrada eléctrica adequada na região intersticial; não havendo barreiras intersticiais o tecido oferece uma resistência eléctrica baixa.

E - CALCULOS E ESTATISTICA

O Desvio Padrão (DP) e o Erro Padrão da Média (EPM) foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$DP = \left(\frac{\Sigma (x_i - \bar{x})^2}{N-1} \right)^{1/2}$$

$$EPM = \frac{DP}{N^{1/2}}$$

N = número de ensaios

A significância das diferenças entre os valores dos fluxos e as fases foi determinada pelo teste t de Student.

A significância da correlação entre as espessuras dos mantos e os respectivos coeficientes de permeabilidade foi determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) e pelo coeficiente de correlação de Spearmans (ρ) que correlaciona os resultados pela sua ordenação em colunas.

$$r = \frac{\Sigma (XY) - \frac{(\Sigma X)(\Sigma Y)}{N}}{\sqrt{\Sigma (X^2) - \frac{(\Sigma X)^2}{N}} \sqrt{\Sigma (Y^2) - \frac{(\Sigma Y)^2}{N}}}$$

$$\rho = \frac{6 \Sigma (D^2)}{N - (N^2 - 1)}$$

D - diferença entre os valores de cada uma das colunas.

RESULTADOS

1 - MEDIÇÃO DOS POTENCIAIS TRANSEPITELIAIS

Seguindo a técnica referida na secção de Materiais e Métodos, foram medidas as diferenças de potencial através de ambos os epitélios do manto e ainda a diferença de potencial total através deste orgão.

Os valores médios obtidos numa série de experiências efectuadas em épocas diferentes encontram-se reunidos no quadro 2.

QUADRO 2 - Valores dos potenciais transepiteliais

N	SEXO	DP TOTAL mV ± DP	POTENCIAL RELATIVO AO INTERIOR DO MANTO	
			CAVIDADE EXTRAPALEAL mV ± DP	CAVIDADE PALEAL mV ± DP
5	♂	0,14 ± 0,25	1,85 ± 0,80	2,10 ± 0,75
6	♀	0,15 ± 0,35	1,77 ± 0,78	1,93 ± 0,84
N - nº de animais ensaiados				

Verifica-se que a diferença de potencial entre o interior do manto e ambas as câmaras (as quais representam a cavidade extrapaleal e a cavidade paleal) apresenta valores muito baixos, em regra inferiores a 2 mV, negativo para o interior do manto. Os valores médios encontrados para as diferenças de potencial entre os dois epitélios não são significativamente diferentes.

Porém, em 90% dos casos verificou-se que o potencial da cavidade paleal era superior em valor absoluto ao da cavidade extrapaleal, sendo a média das diferenças verificadas muito próxima do valor encontrado na

prática para a diferença de potencial total entre as duas faces do manto.

2 - VALORES DOS FLUXOS UNIDIRECCIONAIS DE SÓDIO E DE MANITOL

O quadro 3 representa a totalidade dos valores encontrados para os fluxos de sódio e de manitol.

QUADRO 3 - Valores dos fluxos unidireccionais de sódio e manitol nos mantos de *Mytilus*

Data das colheitas	FLUXOS DE SÓDIO ($\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$)		FLUXOS DE MANITOL ($\mu moles\ h^{-1}\ cm^{-2} \times 10^{-5}$)	
	♂	♀	♂	♀
14.12.82	3,30	1,12	1,07	1,80
4.01.83	10,50	4,42	0,59	0,36
25.01.	5,40	4,16	2,02	1,70
	7,62	6,00	0,59	1,91
17.02.	3,60	2,97	1,71	1,16
	5,73	4,13	0,58	1,56
7.03.	9,79	13,62	1,23	3,40
	6,73	5,52	0,33	0,36
28.03.	5,80	6,24	0,95	1,29
	7,00	4,97	0,47	3,35
19.04.	5,96	4,94	0,30	0,09
	5,27	3,01	0,47	0,83
9.05.	8,83	4,54	0,64	0,82
	4,25	10,89	0,60	0,27
30.05.	4,57	4,65	1,82	1,44
	4,88	9,19	2,99	0,19
29.06.	23,76	16,05	1,03	1,22
	7,82	6,45	6,92	1,34
11.07.	7,19	6,58	0,44	0,41
	3,98	4,86	0,32	0,69
1.08.	18,56	18,10	0,73	0,66
	8,96	11,55	0,64	
22.08.	3,18	4,83	1,38	0,93
	3,23	3,97	2,69	2,13
20.09.	8,84	6,04	0,49	1,23
	5,44	4,01	1,75	0,89
18.10.	2,76	4,40	0,43	0,99
	7,32	2,01	1,49	0,41
8.11.	4,78	4,73	5,40	1,86
	3,57	3,62	0,81	0,89
Valores médios ± DP	6,95 ± 4,45	6,25 ± 4,00	1,36 ± 1,49	1,18 ± 0,82

As médias dos fluxos, tanto de sódio como de manitol, não são significativamente diferentes entre machos e fêmeas, como se pode verificar.

Existe uma variação significativa no valor dos fluxos de acordo com a época do ano, a qual é posta em evidência nos gráficos das figuras 6 e 7.

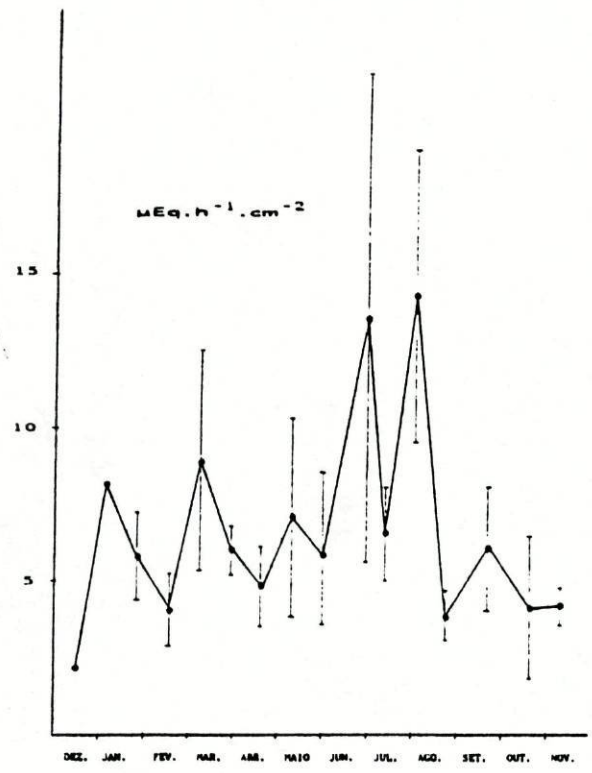


FIG. 6 - Fluxos unidireccionais de sódio (média ± DP) medidos ao longo do ano nos mantos de machos e fêmeas de *Mytilus*

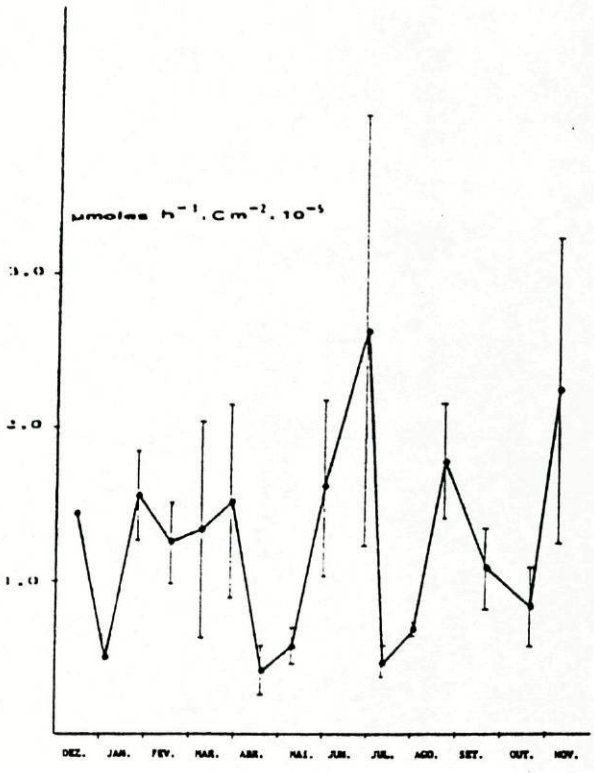


FIG. 7 - Fluxos unidireccionais de manitol (média ± DP) medidos ao longo do ano nos mantos de machos e fêmeas de *Mytilus*

A observação destes resultados indica que os máximos correspondem em regra a épocas em que a variabiliade é maior, e também que esses máximos não correspondem exactamente às mesmas datas quando se comparam os fluxos de sódio com os de manitol.

Tendo sido efectuados cortes histológicos de cada fragmento do

manto utilizado nas experiências de medidas de fluxos, foi possível estabelecer os valores médios dos fluxos para cada fase do ciclo reprodutivo (Quadros 4 e 5).

QUADRO 4 - Valores dos fluxos unidireccionais de sódio obtidos nos mantos de *Mytilus* e ordenados pelas fases do ciclo reprodutivo
Média ± EPM **n** = nº de resultados obtidos para cada fase
resultados expressos em $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$

d_1	d_2	d_3	d_4	s_3	s_2	s_1	0
6,01 ± 0,66 n=7	4,49 ± 0,60 n=6	4,45 ± 0,46 n=14	4,60 ± 0,46 n=7	5,25 ± 0,94 n=4	6,65 ± 1,21 n=5	8,82 ± 1,32 n=9	17,99 ± 2,50 n=4

QUADRO 5 - Valores dos fluxos unidireccionais de manitol obtidos nos mantos de *Mytilus* e ordenados pelas fases do ciclo reprodutivo
Média ± EPM **n** = nº de resultados obtidos para cada fase
resultados expressos em $\mu moles\ h^{-1}\ cm^{-2} \times 10^{-5}$

d_1	d_2	d_3	d_4	s_3	s_2	s_1	0
0,92 ± 0,19 n=8	1,07 ± 0,30 n=9	1,52 ± 0,22 n=14	1,45 ± 0,14 n=7	0,87 ± 0,31 n=4	0,540 ± 0,085 n=5	0,62 ± 0,13 n=6	0,69 n=1

As diferenças encontradas são significativas entre algumas das fases, como se verifica nas figuras 8 e 9: no caso do sódio ocorre um máximo durante a fase 0 e no caso do manitol um máximo nas fases de desenvolvimento d_3 e d_4.

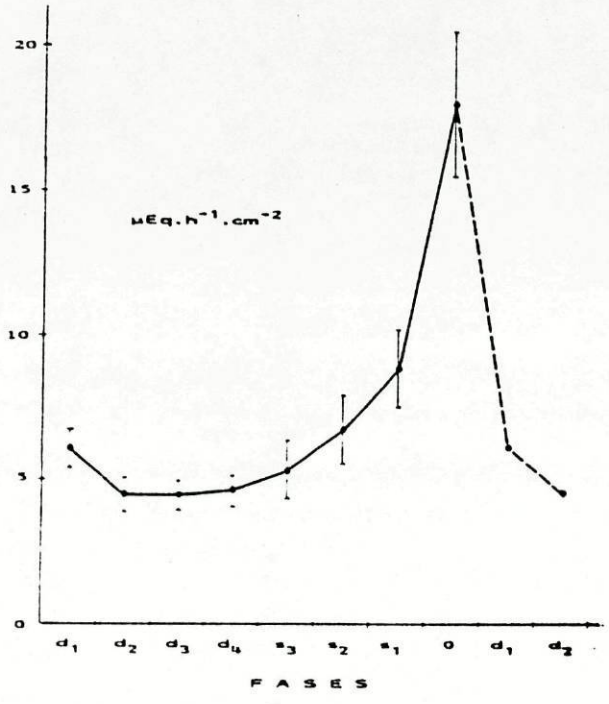


FIG. 8 - Valores dos fluxos unidireccionais médios de sódio obtidos para as diferentes fases do ciclo reprodutivo anual

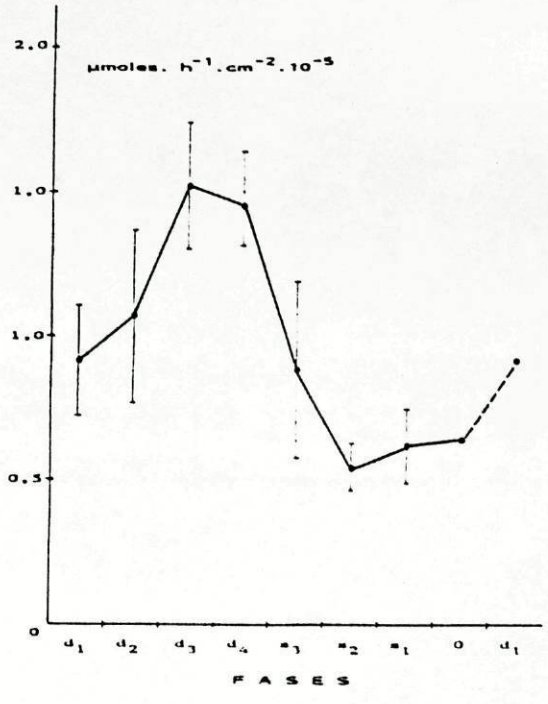


FIG. 9 - Valores dos fluxos unidireccionais médios de manitol obtidos para as diferentes fases do ciclo reprodutivo anual

Analisando os quadros 6 e 7 pode-se verificar que para os fluxos de sódio os valores encontrados para a fase 0 são sempre significativamente diferentes de qualquer outra fase, enquanto que para os fluxos de manitol só se obtiveram diferenças fortemente significativas entre a fase de desenvolvimento máximo (d_4) e as fases mais avançadas de emissão de gâmetas (s_2, s_1 e 0).

QUADRO 6 - Representação da significância das diferenças entre os valores dos fluxos unidireccionais de sódio e as fases do ciclo reprodutivo, determinada pelo teste t de Student

d_1								
d_2	n.s.							
d_3	*	n.s.						
d_4	n.s.	n.s.	n.s.					
s_3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.				
s_2	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.			
s_1	n.s.	*	**	*	n.s.	n.s.		
0	**	**	**	**	**	**	**	
	d_1	d_2	d_3	d_4	s_3	s_2	s_1	0

> 0,05 - não significativo (n.s.)
0,05-0,01 - significativo (*)
< 0,01 - muito significativo (**)

QUADRO 7 - Representação da significância das diferenças entre os valores dos fluxos unidireccionais de manitol e as fases do ciclo reprodutivo, determinada pelo teste t de Student

d_1								
d_2	n.s.							
d_3	n.s.	n.s.						
d_4	*	n.s.	n.s.					
s_3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.				
s_2	n.s.	n.s.	*	**	n.s.			
s_1	n.s.	n.s.	*	**	n.s.	n.s.		
0	n.s.	n.s.	*	**	n.s.	n.s.	n.s.	
	d_1	d_2	d_3	d_4	s_3	s_2	s_1	0

> 0,05 - não significativo (n.s.)
0,05-0,01 - significativo (*)
< 0,01 - muito significativo (**)

3 - FLUXOS DE DESCARGA DE CÁLCIO, MANITOL E SÓDIO

As figuras 10, 11 e 12 mostram três exemplos das curvas que se obtêm nas experiências de descarga de cálcio, manitol e sódio. Nestas figuras:

- ● - representa a quantidade de radioelemento que sai do lado extrapaleal
- o - representa a quantidade de radioelemento que aparece do lado da cavidade paleal

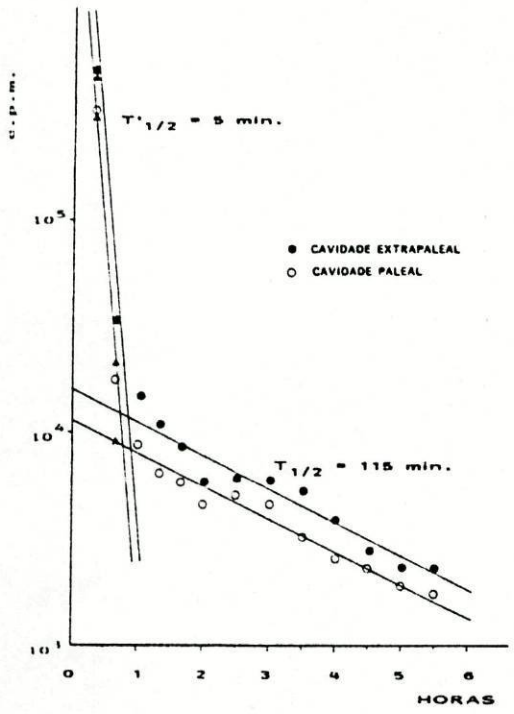


FIG. 10 - Experiência de descarga. Após 23 h de incubação com uma solução marcada com cálcio-45 (5 mEq/l), o tecido foi "lavado" em contínuo com uma solução idêntica mas não radioactiva.
Débito = 3 ml/min
As curvas estão decompostas nas suas exponenciais simples

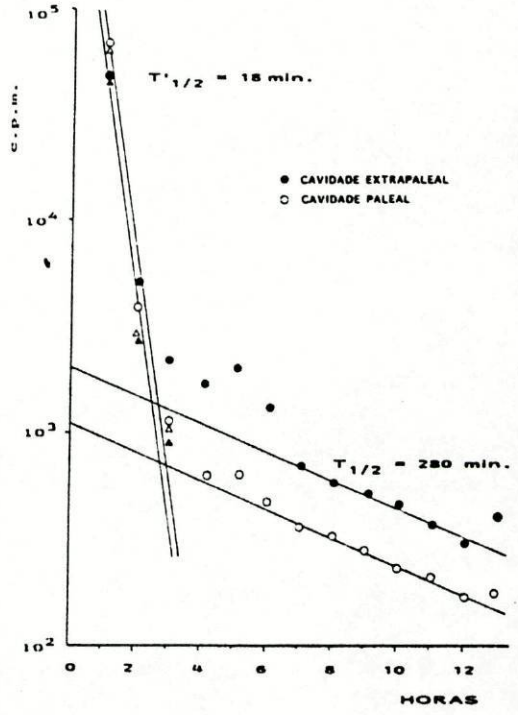


FIG. 11 - Experiência de descarga. Após 23 h de incubação com uma solução marcada com manitol (carbono-14) (7,77 µmoles/l), o tecido foi "lavado" em contínuo com uma solução idêntica mas não radioactiva.
Débito = 3 ml/min
As curvas estão decompostas nas suas exponenciais simples

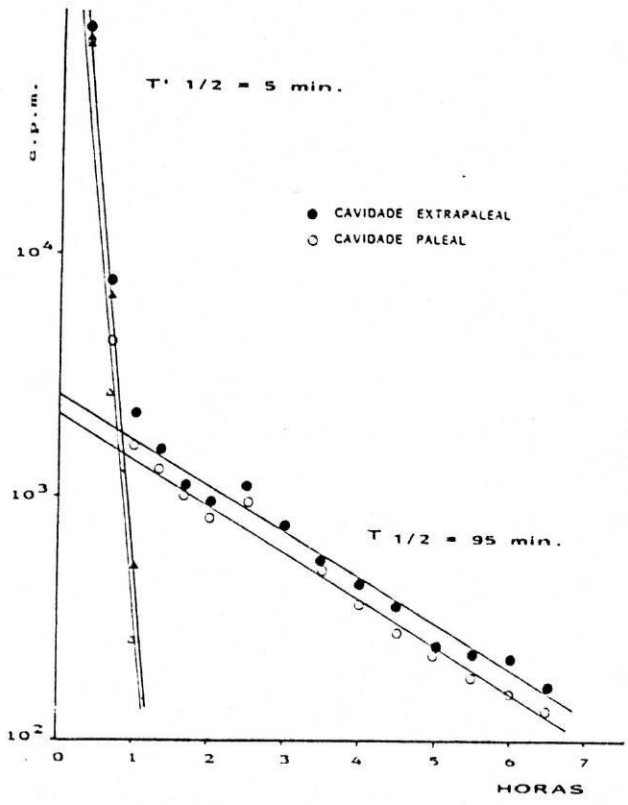


FIG. 12 - Experiência de descarga. Após 23 h de incubação com uma solução marcada com sódio-22 (0,5 Eq/l), o tecido foi "lavado" em contínuo com uma solução idêntica mas não radioactiva.
Débito = 3 ml/min
As curvas estão decompostas nas suas exponenciais simples

Os valores médios do tempo de renovação dos dois compartimentos postos em evidência por este método, bem como dos diferentes coeficientes de transferência para cada compartimento encontram-se reunidos nos quadros (8, 9 e 10) a seguir indicados.

QUADRO 8 - Fluxos de descarga do cálcio

COMPARTIMENTO LENTAMENTE RENOVÁVEL (C.L.R.)					COMPARTIMENTO RAPIDAMENTE RENOVÁVEL (C.R.R.)				
$T_{1/2}$ (min)	$K_{21} + K_{23}$ (min^{-1})	K_{23}/K_{21}	K_{21}	K_{23}	$T'_{1/2}$ (min)	$K'_{21} + K'_{23}$ (min^{-1})	K'_{23}/K'_{21}	K'_{21}	K'_{23}
93,38	0,0081	1,25	0,0036	0,0044	5,50	0,130	1,40	0,057	0,073
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
27,59	0,0027	0,17	0,0013	0,0016	1,07	0,025	0,59	0,019	0,014
(8)	(8)	(7)	(7)	(7)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)

K_{ij} - valor dos coeficientes de transferência (K_{ij} - fracção de compartimento renovado por unidade de tempo) e do período biológico ($T_{1/2}$) dos compartimentos de cálcio, postos em evidência pelas experiências de lavagem.
Entre parêntesis o número de experiências.

QUADRO 9 - Fluxos de descarga do manitol

COMPARTIMENTO LENTAMENTE RENOVÁVEL (C.L.R.)					COMPARTIMENTO RAPIDAMENTE RENOVÁVEL (C.R.R.)				
$T_{1/2}$ (min)	$K_{21} + K_{23}$ (min^{-1})	K_{23}/K_{21}	K_{21}	K_{23}	$T'_{1/2}$ (min)	$K'_{21} + K'_{23}$ (min^{-1})	K'_{23}/K'_{21}	K'_{21}	K'_{23}
304,67	0,00240	1,36	0,00110	0,00130	23,33	0,034	1,26	0,0150	0,0180
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
54,13	0,00048	0,57	0,00034	0,00034	7,14	0,015	0,43	0,0062	0,0096
(15)	*(15)*	*(15)*	*(15)*	*(15)*	*(15)*	*(15)*	*(15)*	*(15)*	*(15)*

K_{ij} - valor dos coeficientes de transferência (K_{ij} - fracção do compartimento renovado por unidade de tempo) e do período biológico ($T_{1/2}$) dos compartimentos de manitol, postos em evidência pelas experiências de lavagem.
Entre parêntesis o número de experiências.

QUADRO 10 - Fluxos de descarga do sódio

COMPARTIMENTO LENTAMENTE RENOVÁVEL (C.L.R.)					COMPARTIMENTO RAPIDAMENTE RENOVÁVEL (C.R.R.)				
$T_{1/2}$ (min)	$K_{21} + K_{23}$ (min^{-1})	K_{23}/K_{21}	K_{21}	K_{23}	$T'_{1/2}$ (min)	$K'_{21} + K'_{23}$ (min^{-1})	K'_{23}/K'_{21}	K'_{21}	K'_{23}
103	0,0070	1,09	0,0034	0,0032	5	0,115	1,10	0,057	0,063
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
22	0,0015	0,45	0,0015	0,0018	2	0,025	0,50	0,016	0,028
(12)	*(12)*	*(11)*	*(12)*	*(12)*	*(12)*	*(12)*	*(11)*	*(12)*	*(12)*

K_{ij} - valor dos coeficientes de transferência (K_{ij} - fracção do compartimento renovado por unidade de tempo) e do período biológico ($T_{1/2}$) dos compartimentos de sódio, postos em evidência pelas experiências de lavagem.
Entre parêntesis o número de experiências.

A observação destes resultados permite desde já concluir que:

- Os tempos de renovação de ambos os compartimentos de manitol são maiores do que os do cálcio e os do sódio.

- Para o cálcio, manitol e sódio, a relação da permeabilidade das duas faces do tecido é a mesma para ambos os compartimentos e não é significativamente diferente de 1, embora na maior parte das experiências se tenha verificado a existência de uma permeabilidade ligeiramente superior do lado da cavidade extrapaleal. Este facto poderá significar que ambos os compartimentos contactam com cada uma das câmaras através da mesma barreira.

4 - VARIAÇÃO DO PESO FRESCO POR UNIDADE DE SUPERFÍCIE DO MANTO EM FUNÇÃO DAS FASES DO CICLO REPRODUTIVO

Com o fim de poder utilizar o peso fresco por unidade de superfície do manto (índice de espessura do manto) como forma indirecta de avaliar o estado de adiantamento do ciclo reprodutivo, foram efectuadas pesagens sistemáticas dos fragmentos de manto utilizados nas experiências de cinética isotópica, e simultaneamente efectuados cortes histológicos de forma a identificar a fase do ciclo reprodutivo, e assim poder-se estabelecer uma correlação entre estes dois parâmetros.

Os resultados obtidos figuram no quadro 11 e na figura 13.

QUADRO 11 - Variação do índice da espessura dos mantos de *Mytilus* no decurso do ciclo reprodutivo
Média ± EPM **n** = número de valores obtidos para cada fase

Índice da espessura representado pela razão peso fresco/ /área (g/cm^2)

d_1	d_2	d_3	d_4	s_3	s_2	s_1	0
0,146 ± 0,014	0,157 ± 0,018	0,141 ± 0,012	0,215 ± 0,016	0,190 ± 0,018	0,089 ± 0,023	0,074 ± 0,012	0,047 ± 0,006
n=15	n=12	n=26	n=13	n=10	n=15	n=9	n=7

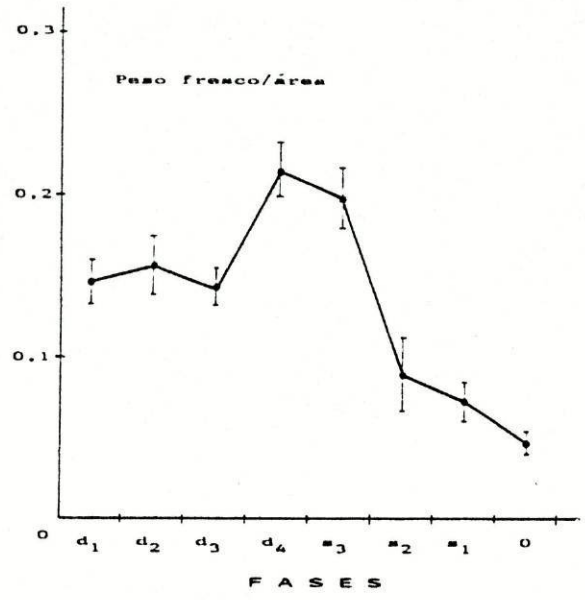


FIG. 13 - Representação gráfica da variação média do índice de espessura da gónada (peso fresco/área) com as fases do ciclo reprodutivo anual

Pela análise estatística destes resultados verificou-se que:

- Os mantos correspondentes a animais na fase 0 e nas fases s_1 e s_2 são aqueles que apresentam um índice de espessura mais baixo, não sendo significativamente diferentes entre si.

- Nota-se um aumento significativo da espessura dos mantos nas fases de desenvolvimento, não sendo as diferenças significativas entre d_1 e d_3. A fase d_4 apresenta um valor mais elevado do que as anteriores.

- O máximo do índice de espessura ocorre nas fases d_4 e s_3.

Em resumo: Os mantos menos "espessos" correspondem a animais nas fases adiantadas de emissão de gâmetas (s_2, s_1 e 0); os mantos mais "espessos" correspondem a animais nas fases de desenvolvimento mais avançado e início da emissão de gâmetas (d_4 e s_3); e, finalmente, o grupo intermédio corresponde a animais nas fases iniciais de desenvolvimento (d_1, d_2 e d_3).

5 - VARIAÇÃO DOS COEFICIENTES DE TRANSFERENCIA EM FUNÇÃO DO INDICE DA ESPESSURA COMO INDICADOR DA FASE

Com o fim de precisar melhor quais os parâmetros cuja variação com a fase do ciclo reprodutivo mais contribuiu para as variações da permeabilidade descritas anteriormente, foi estabelecida a correlação entre os valores dos coeficientes de transferência medidos através dos

fluxos de descarga e a espessura dos respectivos mantos (Fig. 14 a 21).

Pode concluir-se que em relação ao cálcio existe uma correlação negativa entre o valor dos coeficientes de permeabilidade K_{23} e K_{21}, relativos ao compartimento lentamente renovável, e o índice da espessura.

Relativamente ao manitol, pelo contrário, verifica-se a existência de uma correlação positiva entre o índice da espessura e os coeficientes de permeabilidade K'_{23} e K'_{21}, relativos ao compartimento rapidamente renovável.

Para o sódio não foi possível estabelecer uma correlação entre os coeficientes de permeabilidade e o índice da espessura do manto, com excepção para o K_{21} cuja correlação apresentou um valor baixo (-0,470).

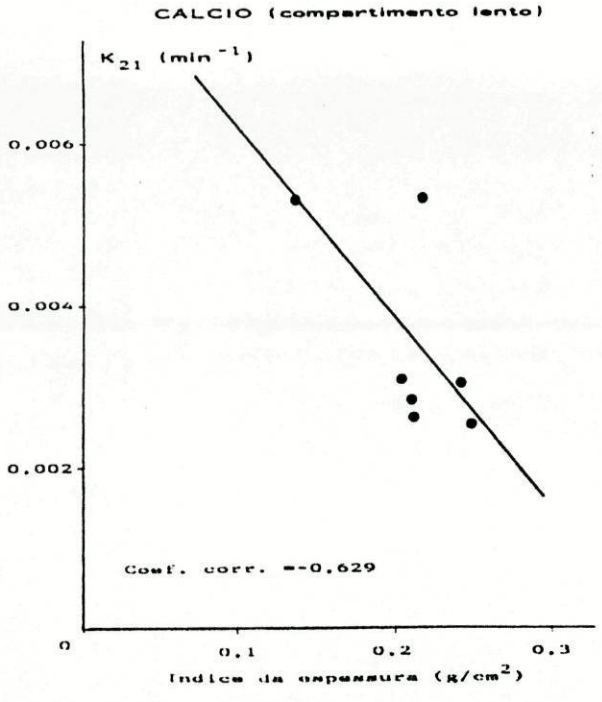


FIG. 14 - Variação do coeficiente de permeabilidade K_{21} para o cálcio correspondente ao compartimento lentamente renovável (cavidade paleal), posto em evidência pelas experiências de descarga, em função do índice de espessura do manto.
Cada ponto representa uma experiência.
Correl. negativa ($0,1<P<0,2$)

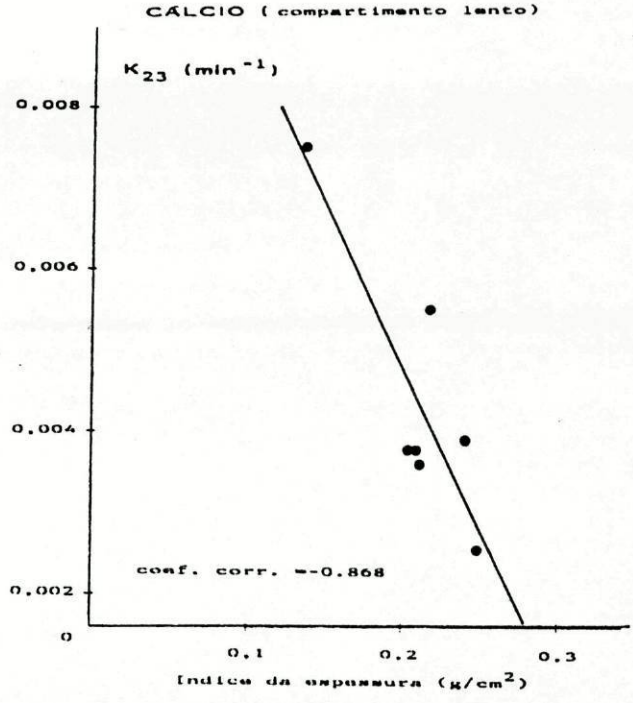


FIG. 15 - Variação do coeficiente de permeabilidade K_{23} para o cálcio correspondente ao compartimento lentamente renovável (cavidade extrapaleal), posto em evidência pelas experiências de descarga, em função do índice de espessura do manto.
Cada ponto representa uma experiência.
Correl. negativa ($0,01<P<0,02$)

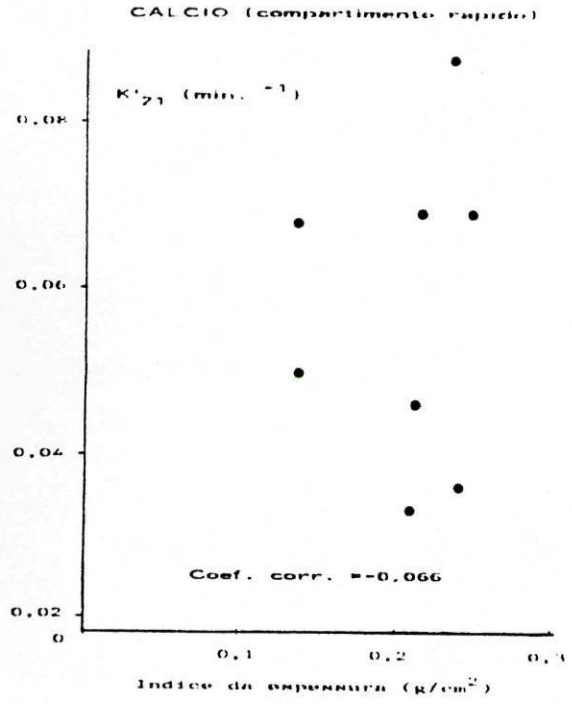


FIG. 16 - Variação do coeficiente de permeabilidade K'_{21} para o cálcio correspondente ao compartimento rapidamente renovável (cavidade paleal), posto em evidência pelas experiências de descarga, em função do índice de espessura do manto.
Cada ponto corresponde a uma experiência

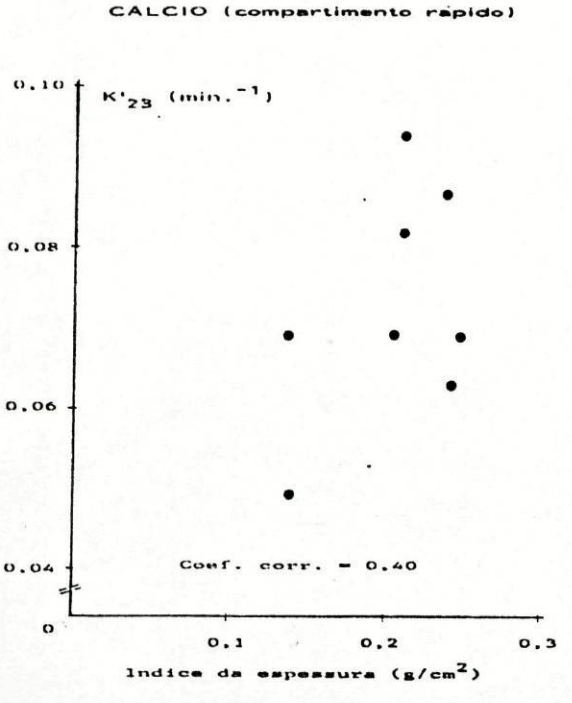


FIG. 17 - Variação do coeficiente de permeabilidade K'_{23} para o cálcio correspondente ao compartimento rapidamente renovável (cavidade extrapaleal), posto em evidência pelas experiências de descarga, em função do índice de espessura do manto.
Cada ponto representa uma experiência

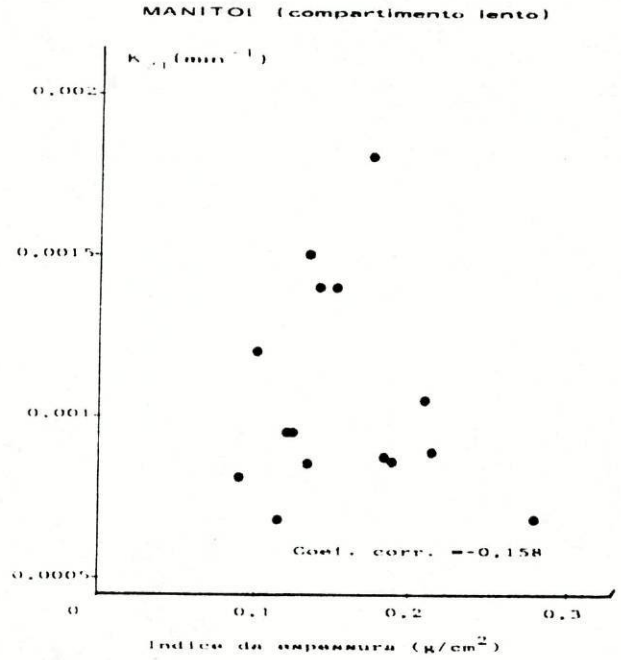


FIG. 18 - Variação co coeficiente de permeabilidade K_{21} para o manitol correspondente ao compartimento lentamente renovável (cavidade paleal), posto em evidência pelas experiências de descarga, em função do índice de espessura do manto.
Cada ponto representa uma experiência

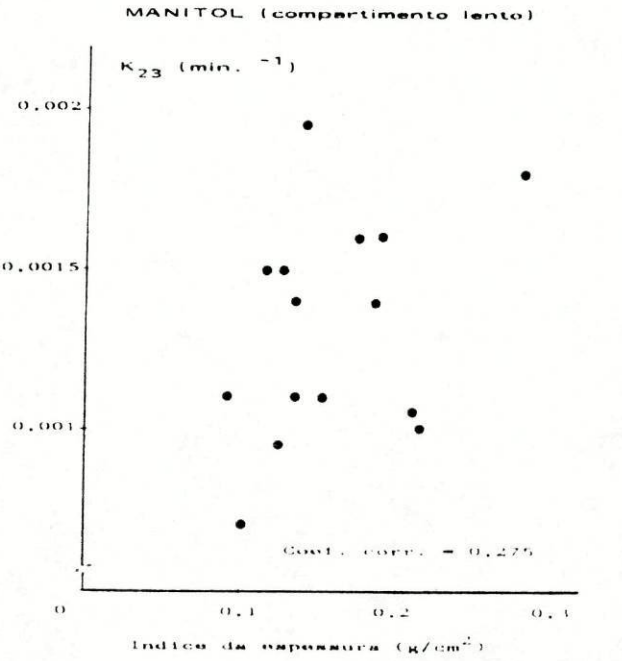


FIG. 19 - Variação do coeficiente de permeabilidade K_{23} para o manitol correspondente ao compartimento lentamente renovável (cavidade extrapaleal), posto em evidência pelas experiências de descarga, em função do índice de espessura do manto.
Cada ponto representa uma experiência

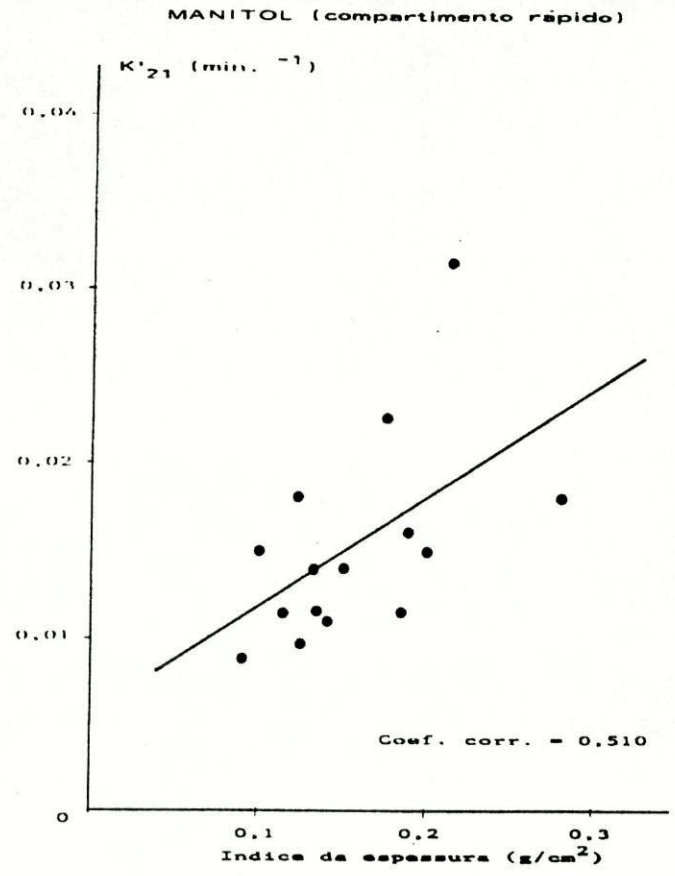


FIG. 20 - Variação do coeficiente de permeabilidade K'_{21} para o manitol correspondente ao compartimento rapidamente renovável (cavidade paleal), posto em evidência pelas experiências de descarga, em função do índice de espessura do manto.
Cada ponto representa uma experiência.
Corr. posit. ($0,1 < P < 0,05$)

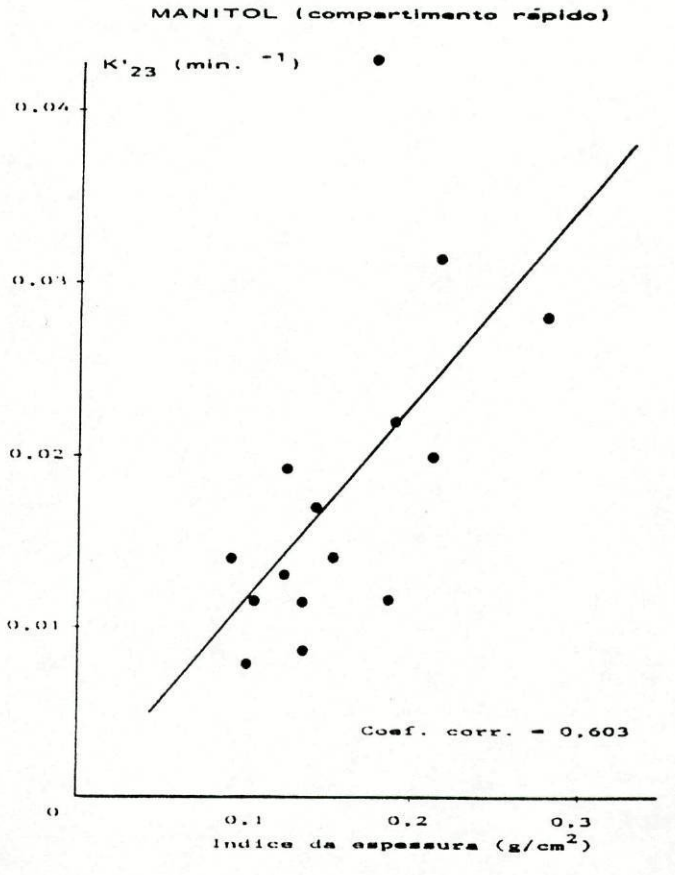


FIG. 21 - Variação do coeficiente de permeabilidade K'_{23} para o manitol correspondente ao compartimento rapidamente renovável (cavidade extrapaleal), posto em evidência pelas experiências de descarga, em função do índice de espessura do manto.
Cada ponto representa uma experiência.
Corr. posit. ($0,02 < P < 0,01$)

6 - CONCENTRAÇÃO DO SÓDIO, POTÁSSIO E CÁLCIO NOS TECIDOS DOS ANIMAIS ESTUDADOS

O doseamento do sódio e do cálcio na totalidade do corpo dos animais estudados mostrou existirem fortes variações ao longo do ano. Os valores encontrados para o sódio variaram entre 22,31 g/kg peso seco (Fevereiro) e 54,86 g/kg peso seco (Julho) e para o cálcio entre 0,92 g/g peso seco (Janeiro) e 5,75 g/g peso seco (Maio), como se pode verificar nas figuras 22 e 23.

Para o potássio verificaram-se apenas pequenas variações (Fig. 24).

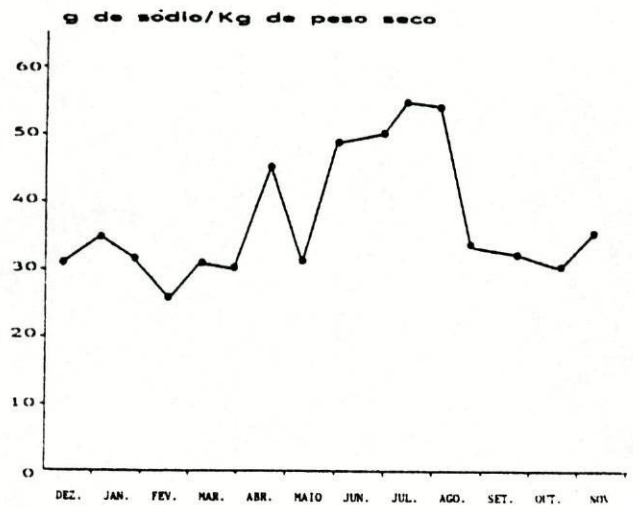


FIG. 22 - Variações sazonais das concentrações de sódio (g/kg peso seco) obtidas nas amostras de *Mytilus*.
O nº de animais analisados foi de 6 (3 machos e 3 fêmeas)

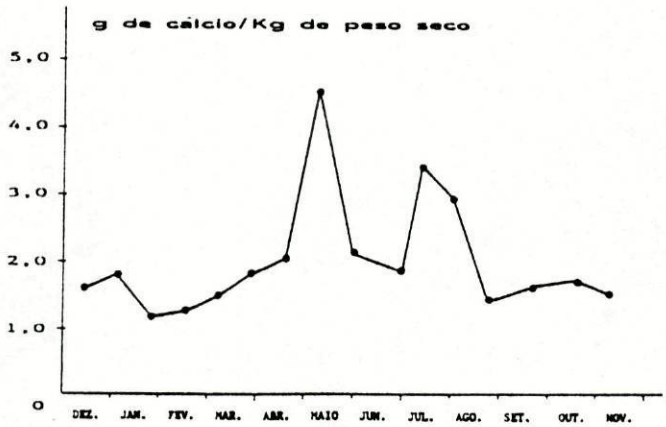


FIG. 23 - Variações sazonais das concentrações de cálcio (g/kg peso seco) obtidas nas amostras de *Mytilus*.
O nº de animais analisados foi de 6 (3 machos e 3 fêmeas)

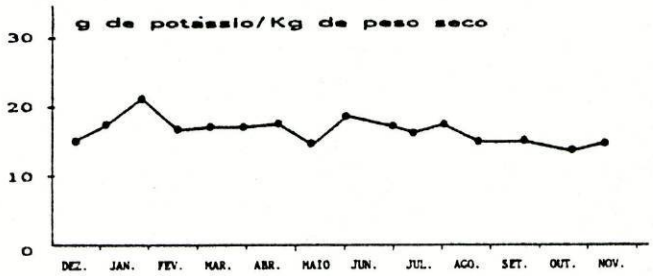


FIG. 24 - Variações sazonais das concentrações de potássio (g/kg peso seco) obtidas nas amostras de *Mytilus*.
O nº de animais analisados foi de 6 (3 machos e 3 fêmeas)

Não se encontraram diferenças significativas entre os valores medidos para machos e fêmeas, razão pela qual os valores apresentados se referem ao conjunto de machos e fêmeas.

Estabelecendo uma relação entre as concentrações doseadas para os três iões e o índice médio da gónada para a mesma época do ano, verificou-se que havia uma correlação muito significativa para os teores de sódio ($0,10<P<0,01$) e de cálcio ($0,01<P<0,02$) quando comparados com este parâmetro, enquanto que para o potássio não havia qualquer correlação, como se pode ver nas figuras 25, 26 e 27.

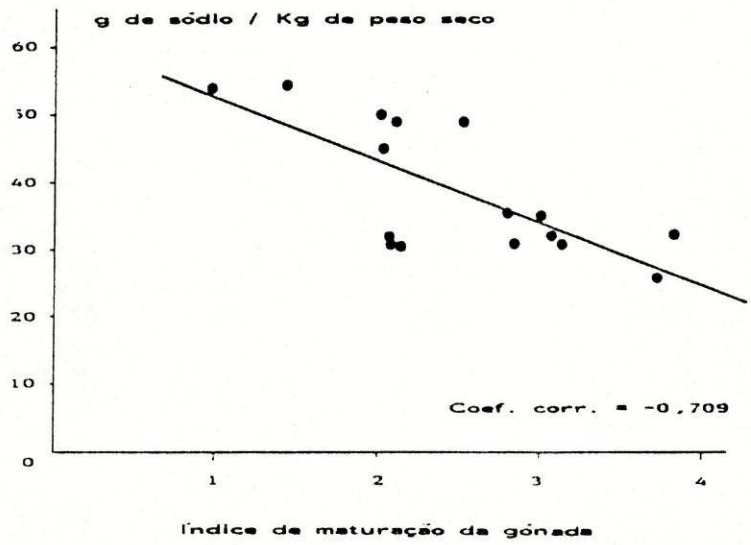


FIG. 25 - Relação da concentração de sódio nos tecidos de *Mytilus* (g/kg peso seco) com o índice médio de maturação da gónada

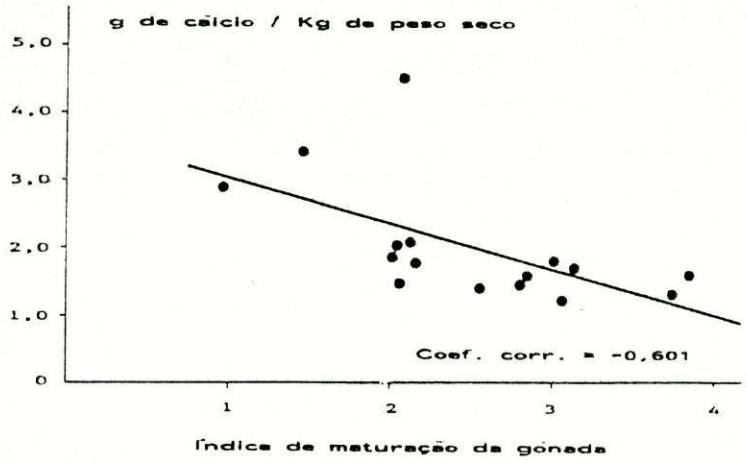


FIG. 26 - Relação da concentração de cálcio nos tecidos de *Mytilus* (g/kg peso seco) com o índice de maturação da gónada

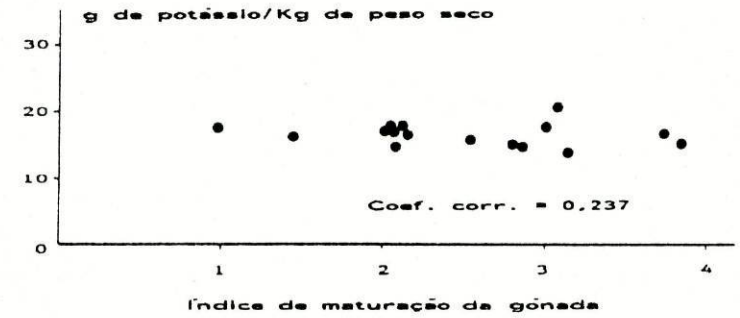


FIG. 27 - Relação da concentração de potássio nos tecidos de *Mytilus* (g/kg peso seco) com o índice de maturação da gónada

7 - GRAU DE HIDRATAÇÃO DOS TECIDOS

Os valores da percentagem de água determinados no animal inteiro e apenas no manto ao longo do ano estão representados nas figuras 28 e 29.

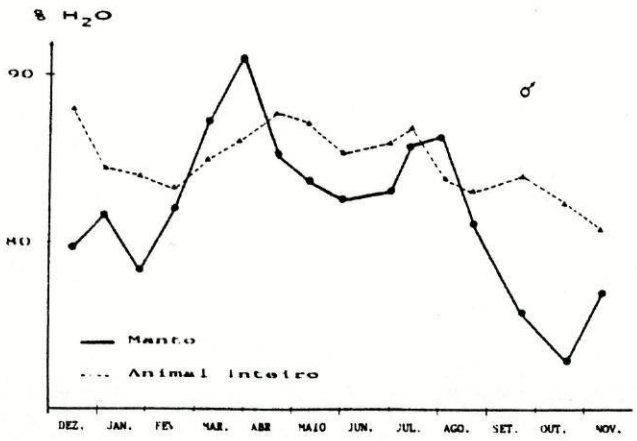


FIG. 28 - Valor médio das variações sazonais da percentagem de água obtido em *Mytilus* macho, quer nos mantos quer nos animais inteiros.
Nº de mantos observados - 4; animais inteiros - de 15 a 20

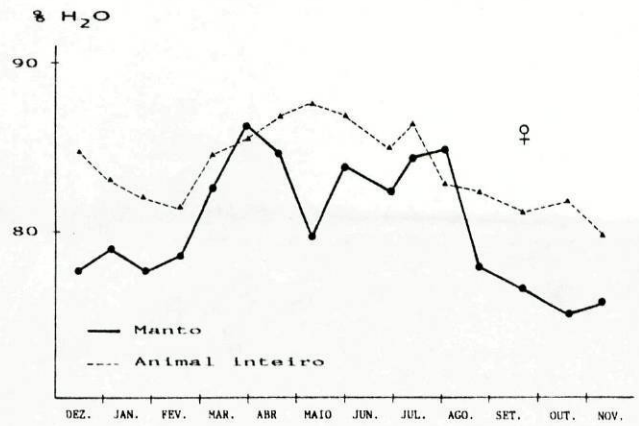


FIG. 29 - Valor médio das variações sazonais da percentagem de água obtido em *Mytilus* fêmea, quer nos mantos quer nos animais inteiros.
Nº de mantos observados - 4; animais inteiros - de 15 a 20

Verifica-se que durante os meses de Outono e Inverno os valores encontrados são, no seu conjunto, menores. As indicações obtidas para o manto mostram ainda existirem dois máximos situados na Primavera e no fim do Verão.

A correlação entre os valores médios da percentagem de água nos mantos e o índice médio de maturação da gónada (Fig. 30) mostra que existe uma correlação negativa fortemente significativa entre estes dois parâmetros (0,001<P).

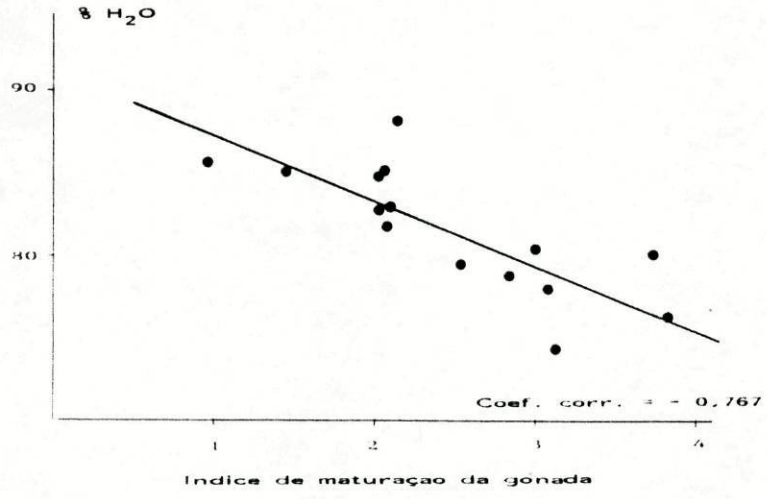


FIG. 30 - Relação da percentagem de água nos mantos de *Mytilus* com o índice médio de maturação da gónada

Como em todos os mantos estudados isoladamente foi determinada a fase do ciclo reprodutivo e paralelamente medida a percentagem de água, pudemos ainda relacionar estes dois parâmetros, como está representado na figura 31.

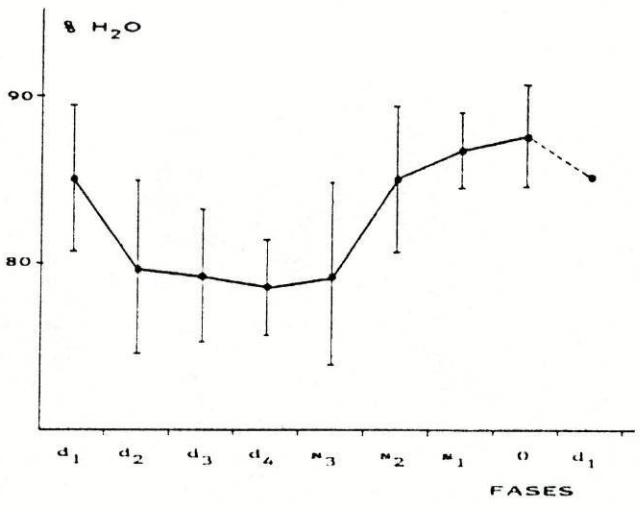


FIG. 31 - Variação da percentagem de água dos mantos de *Mytilus* com as fases do ciclo reprodutivo anual

Pela análise estatística dos resultados verificámos que havia diferenças altamente significativas entre as fases de desenvolvimento d_3 e d_4 e a fase s_3 de início de emissão dos gâmetas, com as fases s_2, s_1 e 0 de emissão total dos gâmetas.

DISCUSSÃO

As experiências de cinética isotópica foram todas efectuadas à temperatura do laboratório. O facto de a temperatura não ser constante pode ter dado origem a algumas variações no valor dos fluxos medidos de um animal ao outro, contribuindo eventualmente para uma maior dispersão dos resultados. Pensamos contudo que estes permanecem sólidos, não só pela pequena amplitude sofrida de facto pela temperatura no interior do laboratório durante o ano (14-18 °C), mas também porque diversos tipos de experiências foram reproduzidas várias vezes em épocas diferentes.

O maior factor de dispersão dos resultados foi porém o estado de desenvolvimento das gónadas. Este factor, que foi devidamente ponderado, veio eventualmente retirar muito do significado das médias apresentadas. Devido a este facto não foi também possível pôr em evidência, sem a utilização da técnica da dupla marcação, qualquer fluxo líquido de sódio ou de cálcio através do simples cálculo estatístico dos fluxos unidireccionais realizados com concentrações iónicas idênticas às da hemolinfa. Algumas experiências realizadas com os dois mantos do mesmo animal não conduziram a qualquer resultado positivo.

A medida dos fluxos unidireccionais de sódio, cálcio e, sobretudo, manitol só foi possível prolongando as experiências por um tempo muito longo, devido à dimensão do compartimento representado pelo tecido, sobretudo quando o animal se encontrava nas fases mais avançadas de desenvolvimento das gónadas. Porém, após um tempo, que no caso das experências efectuadas com manitol marcado oscilava entre 3 a 4 horas, foi sempre possível o cálculo dos fluxos.

Para além da existência de grandes reservas de glicogénio no interior do manto (Lowe et al., 1982), a presença de glucose nos meios de perfusão, bem como a oxigenação destes meios, permitiram manter o tecido vivo ao longo de todo o tempo de duração das experiências, as quais, no caso dos ensaios da acção hormonal, chegaram a durar mais de 24 horas.

As experiências de medida do potencial através do manto mostraram

não haver entre as duas faces do tecido uma diferença de potencial significativa, anulando-se as correntes que passavam através de ambos os epitélios em sentido contrário. Não foi também possível através da medida dos níveis de manitol marcado nas câmaras ao longo do tempo em que decorreu a marcação do tecido (23 h) pôr em evidência qualquer fluxo de água. Desta forma, os fluxos unidireccionais foram medidos em situação de "curto-circuito" e em isosmolaridade.

Se o interesse do trabalho fosse o de pôr em evidência eventuais mecanismos de transporte de iões, ter-se-ia que repetir as experiências nas condições presentes, mas com meios em que a concentração de cada ião fosse mais baixa.

O valor dos fluxos medidos nas condições por nós indicadas não difere muito do que foi encontrado para outros autores para os fluxos de sódio e de cálcio através dos epitélios de superfície de outras espécies de moluscos marinhos. Num mitilídeo muito próximo deste, o mexilhão africano *Perna perna*, Coimbra et al. (1980) encontraram para os fluxos unidireccionais de sódio valores entre 2,8 e 38,4 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ (com uma média de 10,1 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$) e para os fluxos unidireccionais de cálcio valores entre $7,2\times10^{-3}$ e 1 500 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ (com uma média de $309,3\times10^{-3}$ $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$), valores portanto muito próximos dos que encontrámos neste trabalho. Uma revisão da bibliografia existente não permitiu encontrar outros pontos de referência quanto aos valores dos fluxos dos iões através do manto dos lamelibrânquios marinhos.

Para os fluxos medidos através do intestino de um bivalve marinho, *Aplysia*, Gerensen e Ki Hong (1977) encontraram valores médios dentro da mesma ordem de grandeza, embora ligeiramente superiores (32,06 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ para os fluxos de sódio e 35,88 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ para os fluxos de cloro). Porém, para os fluxos de sódio medidos através do intestino do mexilhão *Perna perna*, também os valores médios encontrados foram sensivelmente superiores aos medidos no manto (72,00 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ para o sódio e 2,13 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ para o cálcio).

Alguns outros estudos forneceram dados relativos à absorção ou perda de iões através do tegumento de moluscos marinhos. Porém, estes

estudos, realizados *in vivo* e referidos ao peso total dos animais, não permitem estabelecer qualquer comparação com os resultados por nós obtidos.

As intensidades das trocas de água e de iões através do tegumento exposto dos moluscos de água doce são sensivelmente mais baixas, reflectindo a diminuição geral da permeabilidade dos epitélios destes animais como resposta a uma maior diluição do meio (Prusch e Hall, 1978). Por exemplo em *Anodonta cygnea*, Istin (1970) refere a existência, através do manto, *in vitro*, de fluxos de cálcio da ordem de 0,5 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ para o epitélio face à cavidade paleal, e de 1,5 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ para o epitélio face à cavidade extrapaleal. Através do epitélio exterior do manto do mesmo animal isolado *in vitro*, Machado et al. (1987) encontraram valores médios de 0,26 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ para o sódio e 0,22 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$ para o cálcio. Valores da mesma ordem de grandeza foram descritos por Coimbra (1972) para os fluxos de sódio (0,537 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$) e de cálcio (0,300 $\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$) através do intestino de *Anodonta cygnea*.

Vimos que o sistema de dois compartimentos inicialmente proposto para explicar os fluxos através do manto é uma simplificação excessiva. No seu conjunto este orgão comporta-se como se apresentasse pelo menos um compartimento intermédio separando as duas câmaras, do qual foi possível medir algumas das constantes através dos fluxos de descarga.

A análise dos fluxos de descarga e o cálculo daquelas constantes permite mostrar que:

- Existem na realidade pelo menos dois compartimentos no tecido, tanto no que se refere ao cálcio e ao sódio, como também ao manitol.

- O compartimento mais lentamente renovável de cada uma das substâncias parece corresponder ao interior das células, enquanto o compartimento rápido corresponderia aos espaços extracelulares.

  Estudos efectuados por outros autores no músculo retractor anterior do bisso (ABRM) parecem confirmar esta hipótese. Fluxos de descarga de cálcio medidos neste músculo por Hagiwara (1970) dão

para o compartimento celular (compartimento lento) valores de tempo de renovação de 108 min (± 10) e para o compartimento extracelular (compartimento rápido) 6 min. No mesmo tecido Bloomquist (1972) refere para os dois compartimentos, respectivamente, 83 min (± 5 min) e 7 min. Muito próximos, como se vê, dos que encontrámos para os mantos de *Mytilus*.

- O manitol penetra muito pouco nas células e o tempo de renovação de ambos os compartimentos é muito maior do que o do sódio ou do cálcio.
  O facto de ser semelhante em cada animal e para cada ião a relação da permeabilidade das barreiras que separam cada um dos compartimentos das duas câmaras, faz supor que o compartimento lentamente renovável se esvaziará através do compartimento rapidamente renovável.

- A permeabilidade tanto ao sódio e ao cálcio, como ao manitol, da barreira face à cavidade extrapaleal (epitélio exterior do manto) não é, nas condições experimentais utilizadas, muito diferente da barreira oposta (epitélio da cavidade paleal). Tal não sucede aparentemente nos animais de água doce, a avaliar pelos resultados obtidos por Istin (1970) que encontrou em *Anodonta cygnea* um factor 4 entre o valor da permeabilidade daqueles epitélios ao cálcio, sendo mais permeável o epitélio face à cavidade extrapaleal.

Neste último tecido não foi possível pôr em evidência qualquer transporte activo de cálcio, sódio, potássio ou cloro. Apenas foi demonstrada a existência de um fluxo de bicarbonato dirigido da cavidade extrapaleal para a hemolinfa (Machado et al., 1987). Comparando ainda os valores obtidos por este autor e também por Istin (1970) para o coeficiente de permeabilidade ao cálcio de ambos os epitélios do manto (K_{21} = 0,009 e K_{23} = 0,027 para o compartimento lento) com os que obtivemos, verificamos, mais uma vez, uma muito menor permeabilidade dos epitélios dos animais de água doce relativamente aos animais marinhos, o que se compreende pela necessidade que aqueles animais têm de reter iões e de evitar a entrada de água (ver por exemplo Hoar, 1975), problemas que não se põem aos animais marinhos deste grupo, que vivem

em situação de isosmolaridade em relação ao meio.

A variação do valor dos fluxos ao longo do ano mostra que existe uma correlação estreita entre a permeabilidade do epitélio do manto e a evolução do ciclo reprodutivo. Experiências idênticas efectuadas por Coimbra et al. (1980) mostram que não se trata de um mero efeito sobre a espessura do manto, orgão que aloja, como se sabe, as gónadas, pois a variação da permeabilidade ao sódio e ao cálcio é extensiva ao intestino daqueles animais.

Variações idênticas da permeabilidade do manto de *Anodonta*, traduzidas em variação de corrente de curto-circuito através do epitélio exterior daquele orgão, foram igualmente verificadas por Machado et al. (1987). Da mesma forma Coimbra et al. (1980) verificaram uma forte variação sazonal (relativa ao ciclo reprodutivo) dos fluxos de cloro através do intestino deste lamelibrânquio de água doce. O aumento da permeabilidade aos iões do epitélio face à cavidade extrapaleal, nomeadamente ao cálcio, parece estar de acordo com as épocas de maior crescimento da concha, as quais se situam sobretudo nas fases de repouso sexual (Broom e Mason, 1978), alternando assim o crescimento linear com o desenvolvimento das gónadas.

O ciclo reprodutivo condiciona igualmente o valor de um grande número de parâmetros fisiológicos, tais como as reservas de lípidos, proteínas e hidratos de carbono (Zandee et al., 1980), e o consumo de oxigénio (De Vooys, 1976).

A evolução da permeabilidade dos epitélios do manto com as fases do ciclo reprodutivo implica ou a existência de um ou mais factores hormonais, possivelmente com origem no sistema nervoso do animal (factores conhecidos como agindo na gametogénese, na vitelogénese ou na postura, evidenciados por Joosse (1978), ou cujo aparecimento coincide com estes) ou ainda das hormonas produzidas nas próprias gónadas, tais como aquelas que pusemos em evidência no capítulo anterior.

É conhecida a existência de flutuações nos níveis de aminas armazenadas em vesículas situadas em células dos gânglios (sobretudo dos gânglios cerebropleurais) do sistema nervoso destes animais, lançadas na circulação imediatamente antes da postura (Lubet e Mathieu, 1982).

É ainda conhecida a relação entre certas hormonas do sistema nervoso, e em particular certas aminas (serotonina, por exemplo), e a permeabilidade dos epitélios de superfície de outros animais (Bloomquist e Curtis, 1972). As hormonas esteróides são igualmente conhecidas como tendo uma acção na permeabilidade de certos tecidos (Whitehead e Saleudin, 1978).

Finalmente, referiremos um outro parâmetro que apresenta uma variação acentuada ao longo do ciclo reprodutivo, que é a concentração de alguns iões como o sódio, o potássio e o cálcio.

Dos estudos feitos, em moluscos marinhos, de medição dos níveis de iões durante períodos longos, referiremos os de Beninger (1985), com os quais estabeleceremos um paralelismo com os resultados por nós obtidos:

- Os valores medidos para o Na^+ (Fig. 22), referidos a peso seco, mostraram ser mais elevados no Verão, correspondendo também aos valores mais elevados da salinidade e seguindo de perto a curva de variação da percentagem de água nos tecidos, valores que estavam de acordo com os obtidos por Beninger (1985).
- Os níveis de Ca^{2+} (Fig. 23), embora com diferenças menos acentuadas, permitem-nos mostrar que os valores mais elevados foram encontrados na Primavera e Verão, o que não tinha sido possível demonstrar àquele autor, que descreveu flutuações deste ião ao longo do período em que efectuou as medições.

Mas o que nos parece importante de realçar é a correlação por nós encontrada entre os níveis destes iões (mais evidente para o Na^+) e a fase do ciclo reprodutivo dos animais. É também importante lembrar que é nos períodos de maior actividade gametogénica que encontrámos os níveis mais elevados de esteróides e de aminas do sistema nervoso, como já referimos anteriormente.

- Quanto aos níveis de K^+ encontrámos uma uniformidade nos valores obtidos (Fig. 24), o que pensamos estar de acordo com a localização celular deste ião, iminentemente intracelular, sendo muitas vezes usado como termo de comparação em relação ao estudo de outros parâmetros, exactamente por apresentar variações pouco significativas. Não encontrámos qualquer correlação entre a

concentração de K^+ e a fase do ciclo reprodutivo. Também neste caso os nossos valores não diferem muito dos obtidos por Beninger.

BIBLIOGRAFIA

BENINGER, P.G. (1985). Long-term variations in cation content of two populations of adult marine clam (*Tapes decussatus* L. and *T. philippinarum*) reared in a common habitat. *Comp. Biochem. Physiol.* **82A** (4): 945-949.

BLOOMQUIST, E. and CURTIS, B.A. (1972). The action of serotonin on Calcium-45 efflux from the anterior byssal retractor muscle of *Mytilus edulis*. *J. Gen. Physiol.* **59**: 476-485.

BROOM, M.J. and MASON, J. (1978). Growth and spawning in the pectinid *Chlamys opercularis* in relation to temperature and phytoplankton concentration. *Mar. Biol.* **47**: 277-285.

BURRELL, D.E. and STEFANO, G.B. (1981). Analysis of monoamine accumulations in the neuronal tissues of *Mytilus edulis* (Bivalvia) - I. Ganglionic variations. *Comp. Biochem. Physiol.* **70C**: 71-76.

CHAISEMARTIN, C. (1968). Contrôle neuroendocrinien du renouvellement hydro-sodique chez *Lymnaea limosa* L. *C. R. Sciences. Soc. Biol.* **162**: 1994-1998.

COIMBRA, J. (1972). Transport d'ions au niveau du rectum d'*Anodonta cygnea* (Mollusque, Lamellibranche). Thèse "Doctorat d'Université" presentée à l'Université de Nice.

COIMBRA, A.M., BALDAIA, J.L. and COIMBRA, J. (1980). The role of the gills in the calcium balance in bivalve molluscs. Proceedings of the International Union Physiological Sciences, vol. XIV: 1102.

DE VOOYS, C.G.N. (1976). The influence of temperature and time of year on the oxygen uptake of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **36**: 25-30.

DILLAMAN, R.M., SALEUDDIN, A.S.M. and JONES, G.M. (1976). Neurosecretion and shell regeneration in *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Can. J. Zool.* **54** (10): 1771-1778.

DOGTEROM, A.A., VAN LOENHOUT, H. and VAN DER SCHORS, R.C. (1979). The effects of the growth hormone of *Lymnaea stagnalis* on shell calcification. *Gen. Comp. Endocr.* **39**: 63-68.

DOGTEROM, A.A. and JENTJENS, T. (1980). The effect of the growth hormone of the pond snail *Lymnaea stagnalis* on periostracum formation. *Comp. Biochem. Physiol.* **66A**: 687-690.

DOGTEROM, A.A. and VAN DER SCHORS, R.C. (1980). The effect of the growth hormone of *Lymnaea stagnalis* on (bi)carbonate movements, especially with regard to shell formation. *Gen. Comp. Endocr.* **41**: 334-339.

ELEKES, K. (1976). Electron microscopic autoradiography of serotonin uptake in the ganglia of the fresh-water mussel (*Anodonta cygnea* L.). *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **27** (2-3): 183-189.

FREAS, W. and GROLLMAN, S. (1980). Ionic and osmotic influences on prostaglandin release from the gill tissue of a marine bivalve, *Modiolus demissus*. *J. Exp. Biol.* **84**: 169-185.

GERAERTS, W.P.M. (1976). Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocr.* **29**: 61-71.

GERENCSER, G.A. and HONG, S.K. (1977). Ion transport in *Aplysia juliana* intestine: stimulation by exogenous sugars. *Comp. Biochem. Physiol.* **58A**: 275-280.

GERENCSER, G.A., MUSTAFA, T. and HONG, S.K. (1977). The relationship between intracellular Na^+ and energy charge potential in the kidney slice of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **58A**: 329-331.

GREENAWAY, P. (1970). Sodium regulation in the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *J. Exp. Biol.* **53**: 147-163.

GREENAWAY, P. (1971). Calcium regulation in the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). I. Effect of internal and external calcium concentration. *J. Exp. Biol.* **54**: 199-214.

HAGIWARA, E. and NAGAI, T. (1970). ^{45}Ca movements at rest and during potassium contracture in *Mytilus* ABRM. *Jap. J. Physiol.* **20**: 72-83.

HIRIPI, L., BURRELL, D.E., BROWN, M. ASSANAH, P., STANEC, A. and STEFANO, G.B. (1982). Analysis of monoamine accumulations in the neuronal tissues of *Mytilus edulis* and *Anodonta cygnea* (Bivalvia) - III. Temperature and seasonal influences. *Comp. Biochem. Physiol.* **71C** (2): 209-213.

ILLANES-BUCHER, J. and LUBET, P. (1980). Étude de l'activité neurosécrétrice au cours du cycle sexuel annuel de la moule (*Mytilus edulis* L.). Mollusque Lamellibranches. *Bull. Soc. Zool. France* **105** (1): 141-145.

ISTIN, M. (1964). Perméabilité au calcium du manteau de divers lamellibranches étudiée à l'aide d'isotopes radioactifs. Thèse de Doctorat de Spécialité. Faculté des Sciences, Paris.

ISTIN, M. (1970). Rôle du manteau dans le métabolisme du calcium chez les lamellibranches. *Bull. du C.N.R.S.* **144**: 53-80.

JANACEK, K. (1962). The effect of low concentration of thiol-group blocking agent on the outer membrane of frog skin. *Biochem. Biophys. Acta* **56**: 42.

JOOSSE, J. (1964). Endocrinology of molluscs. *Colloques Intern. C.N.R.S.* **251**: 107-123.

JOOSSE, J. (1964). Dorsal bodies and dorsal neurosecretory cells of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis*. *L. Arch. Neer. Zool.* **15**: 1--103.

KHAN, H.R. and SALEUDDIN, A.S.M. (1979). Osmotic regulation and osmotically induced changes in the neurosecretory cells of the pulmonate snail *Helisoma*. *Can. J. Zool.* **57**: 1371-1383.

KIRSCHNER, L.B. (1970). The study of NaCl transport in aquatic animals. *Am. Zoologist.* **10**: 365-376.

KUPFERMANN, I. (1967). Stimulation of egg laying: possible neuroendocrine function of bag cells of abdominal ganglion of *Aplysia californica*. *Nature* **216**: 814-815.

LEUNG, M.K. and STEFANO, G.B. (1984). Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 955-958.

LOWE, D.M., MOORE, M.N. and BAYNE, B.L. (1982). Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **62**: 133-145.

LUBET, P. (1956). Effets de l'ablation des centres nerveux sur l'émission des gamètes chez *Mytilus edulis* L. et *Chlamys varia* L. (Mollusques Lamellibranches. *Ann. Sc. Nat. Zool.* 11^{e} série: 175--183.

LUBET, P. and MATHIEU, M. (1982). The action of internal factors on gametogenesis in pelecypod molluscs. *Malacologia* **22** (1-2): 131--136.

MACHADO, J.P., COIMBRA, J., FERREIRA, K.G. and FERREIRA, H.G. (1987). Ion transport across the outer epithelium of the mantle of *Anodonta cygnea* and shell formation. Em publicação.

MEECH, R.W. (1972). Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **42A**: 493-499.

MOTAIS, R. and MAETZ, J. (1964). Action des hormones neurohypophysaires sur les échanges de sodium (mesurées à l'aide du radio-sodium ^{22}Na) chez un téléostéen euryhalin *Platichthys flesus* L. *Gen. Comp. Endocr.* **4**: 210-224.

NAGABHUSHANAN, R. (1964). Neurosecretory cell types in the nervous system of the lamellibranch mollusk *Rangia cuneta* (Gray). *Sci. Cult.* **31**: 156.

NEFF, J. (1972). Ultrastructure of the outer epithelium of the mantle in the clam *Mercenaria mercenaria* in relation to calcification of the shell. *Tissue and Cell* **4**: 591-600.

PAPARO, A. (1980). The regulation of intracellular calcium and the release of neurotransmitters in the mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **66A**: 517-520.

PRUSCH, R.D. and HALL, C. (1978). Diffusional water permeability in selected marine bivalves. *Biol. Bull.* **154**: 292-301.

SALEUDDIN, A.S.M., WILSON, L.E., KHAN, H.R. and JONES, G.M. (1980). Effects of brain extracts on oocyte maturation in *Helisoma* (Pulmonata: Mollusca). *Can. J. Zool.* **58** (6): 1109-1124.

SPAFFORD, D.C. and PENGELLEY, E.T. (1971). The influence of the neurohumor serotonin on hibernation in the golden-mantled ground squirrel, *Citellus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **38A**: 239--250.

STEFANO, G.B. and AIELLO, E. (1975). Histofluorescent localization of serotonin and dopamine in the nervous system and gill of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Biol. Bull.* **148**: 141-156.

STEFANO, G.B., CATAPANE, E. and AIELLO, E. (1976). Dopaminergic agents: influence on serotonin in the molluscan nervous system. *Science* **194**: 539-541.

STEFANO, G.B., HIRIPIS, L. and CATAPANE, E.J. (1977). The effects of short and long term temperature stress on serotonin, dopamine and norepinephrine concentrations in molluscan ganglia. *J. Thermal Biology* **3**: 79-83.

STEFANO, G.B. and CATAPANE, E.J. (1977a). The effects of temperature acclimation on monoamine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **203**: 449-456.

STEFANO, G.B. and CATAPANE, E.J. (1977b). Seasonal monoamine changes in the central nervous system of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Experientia* **33** (10): 1341-1342.

STEFANO, G.B. and AIELLO, E. (1978). Distribution of radioactivity after administration of ^{3}H-5-hydroxytryptamine by three different routes to the mussel *Mytilus edulis*. *Experientia* **34** (6): 749-750.

STEFANO, G.B. and CATAPANE, E.J. (1980). Norepinephrine: its presence in the central nervous system of the bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Exp. Zool.* **214**: 209-213.

STEINBACH, H.B. (1933). The electrical potencial difference across living frog skin. *J. Cell. Comp. Physiol.* 3: 1.

SWINDALE, N.V. and BENJAMIN, P.R. (1976). The anatomy of neurosecretory neurones in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Philos. Trans. R. Soc. London.* Ser. B **274**: 169-202.

USSING, H.H. and ZERAHN, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23: 110-127.

VACCARI, A. (1985). Selective effects of gonadal steroids on the reponse of peripheral serotonin receptors. *Experientia* **41**: 407--408.

VAN AARDT, W.J. (1968). Quantitative aspects of the water balance in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Neth. J. Zool.* **18**: 253-312.

VARAKSIN, A.A. (1978). Neurosecretions of the bivalves *Crenomytilus grayanus* and *Patinopecten yessoensis*. *Biologiya Morya* **4**: 58-65.

WENDELAAR BONGA, S.E. (1970). Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Z. Zeleforsch.* **108**: 190-224.

WENDELAAR BONGA, S.E. (1971). Osmotically induced changes in the activity of neurosecretory cells located in the pleural ganglia of the fresh water snail *Lymnaea stagnalis* (L.) studied by quantitative electron microscopy. *Neth. J. Zool.* **21**: 127-158.

WENDELAAR BONGA, S.E. (1972). Neuroendocrine involvement in osmoregulation in a freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocr.* (3): 308-316.

WHITEHEAD, D.L. (1977). Steroids enhance shell regeneration in an aquatic gastropod (*Biomphalaria glabrata*). *Comp. Biochem. Physiol.* **58C**: 137-141.

WHITEHEAD, D.L. and SALEUDDIN, A.S.M. (1978). Steroids promote shell regeneration in *Helix aspersa* (Mollusca: Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.* **59C**: 5-10.

ZANDEE, D.I., KLUYTMANS, J.H., ZURBURG, W. and PETERS, H. (1980). Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Neth. J. Sea Res.* **14** (1): 1-29.

CAPÍTULO IV

INTRODUÇÃO

Nos tecidos dos organismos superiores as células perderam alguma da sua individualidade para funcionarem como um conjunto. A fim de acompanhar esta unificação e promover a necessária interacção entre as células, apareceram, a nível da membrana, zonas especializadas de contacto intercelular.

Podem ser consideradas três categorias de junções intercelulares: (1) **junções apertadas** ("tight junctions"), que permitem que o organismo ou o orgão mantenha um meio interno quimicamente distinto do meio que o rodeia; (2) **junções aderentes** (desmosomas), que promovem a coesão entre as células de um tecido reforçando a sua integridade física; (3) **junções de comunicação** ("gap junctions"), que permitem a troca de nutrientes e moléculas entre as células.

As junções apertadas, onde as membranas plasmáticas de duas células adjacentes parecem fundir-se, estabelecem uma zona de contacto estreito envolvendo completamente cada célula.

As réplicas obtidas pela técnica de congelamento-fractura mostraram que estas estruturas eram constituídas por duas filas de partículas estreitamente ligadas (proteínas integrais da membrana), cada uma das quais contactando com a membrana plasmática adjacente, de maneira a fecharem os espaços intercelulares e a bloquearem a passagem de moléculas através dos epitélios.

Tecidos de transporte, como por exemplo o túbulo proximal do rim, onde os espaços intercelulares só apresentam uma ou duas zonas de contacto, oferecem fraca resistência à passagem de iões; pelo contrário, tecidos como a bexiga, que apresentam seis ou mais zonas de contacto intercelulares, oferecem uma resistência eléctrica elevada e permitem a formação de gradientes de concentração através do epitélio.

O'Donnel e Maddrell (1983) estudaram as vias de transporte paracelular e transcelular dos movimentos de água e de solutos através dos epitélios de excreção dos insectos, como os túbulos de Malpighi e as

glândulas salivares.

Estudos (entre os quais os de Curran, 1960) efectuados noutros epitélios sugeriam que os espaços laterais intercelulares da vesícula biliar do coelho formavam canais cilíndricos fechados numa das extremidades pelas junções de contacto, e que o transporte de sais para essa extremidade gerava um gradiente osmótico localizado.

Elias et al. (1983) testaram o aumento da permeabilidade da membrana biliar à ^{3}H-inulina e ^{14}C-sacarose, pela acção dos esteróides, sugerindo a existência de um refluxo de compostos da bílis para o plasma pela via paracelular, possivelmente pela abertura de canais sob a acção do etinilestradiol.

Relativamente às junções de comunicação (3), elas estão largamente distribuídas no reino animal, podendo ser facilmente reconhecidas pela sua estrutura característica. Aparecendo muito cedo, ainda na embriogénese (Loewenstein, 1979; Hertzber et al., 1981), demonstram bem o seu papel na transmissão de sinais reguladores importantes para o crescimento e diferenciação dos tecidos.

As técnicas de Microscopia Electrónica vieram permitir a visualização destas estruturas pela observação de cortes ultrafinos em contraste negativo e também pela técnica de congelamento-fractura das membranas. Pôde assim ser observada a existência de um espaço de espessura constante ("gap") entre as membranas de células adjacentes, constituído por conjuntos de unidades (semicanais) embebidas na membrana da célula e em correspondência com estruturas idênticas na membrana da célula oposta. Cada uma destas unidades era formada por subunidades proteicas, ordenadas de maneira a formarem um canal (Revel et al., 1985). Eram estes canais que permitiam que o interior citoplasmático das células adjacentes estivesse em comunicação, a fim de ser possível uma repartição de iões e de compostos orgânicos intervenientes no metabolismo, de maneira a que fosse conservada a homeostasia interna dos tecidos (Loewenstein, 1981).

A formação ou a destruição destas comunicações pode ser influenciada por compostos como hormonas, vitaminas e neurotransmissores.

Sabe-se que a permeabilidade destes canais está estreitamente

ligada à concentração intracelular dos iões cálcio. De um modo geral, o nível de cálcio na forma livre (Ca_i) no citoplasma é bastante baixo. Assim, uma injecção de Ca_i na célula elevando-o para níveis relativamente altos, provocará uma redução no aparecimento destas junções (Rose e Loewenstein, 1970, 1975). A vitamina A pode também aumentar notavelmente o número destas junções nos tecidos epiteliais (Elias e Friend, 1976; Elias et al., 1983). A acção das hormonas (esteróides) nestas estruturas tem um carácter marcadamente fisiológico; é exemplo disso o aumento do número destas junções durante o trabalho do parto e a sua redução no período da ovulação, ou ainda a sua intervenção na diferenciação do oócito e no sincronismo da contracção do músculo uterino (Burghardt e Anderson, 1979; Garfield et al., 1980; Sims et al., 1982; Cole et al., 1983).

Segundo Osa e Sgusawara (1984), as hormonas do ovário (progesterona e 17β-estradiol) exerciam *in vitro* uma dualidade de acções sobre o músculo uterino. Doses altas de estradiol estimulavam, segundo MacKenzie et al. (1983), o desenvolvimento das "gap junctions" no miométrio de ratas jovens ou ovariectomizadas. Garfield et al. (1980) verificaram que a presença da progesterona inibia o aumento do número destas junções no miométrio, quando estimuladas pelos estrogénios. Para Dahl e Berger (1978) a presença das junções de comunicação era praticamente nula no útero da rata virgem, mas a aplicação de estrogénios promovia rapidamente o seu aparecimento, as quais eram formadas pela confluência de subunidades pré-existentes na membrana celular ou pela biossíntese de novas unidades.

Estudos ultra-estruturais e electrofisiológicos conduzidos nos últimos anos mostraram que podem ocorrer nas gónadas ligações entre as células germinativas e as células somáticas (as chamadas junções heterocelulares). Ligações deste tipo foram primeiramente detectadas nos ovários dos mamíferos (Anderson e Albertini, 1976), nos testículos dos mamíferos (McGinley et al., 1979) e dos insectos (Szöllösi e Marcaillon, 1980), bem como nos ovários dos insectos (Hebner, 1981) e dos moluscos (Saleudin et al., 1980).

A função destas junções na gónada feminina dos mamíferos estava relacionada com a regulação da maturação dos oócitos e a cooperação

metabólica entre as células da granulosa e dos oócitos (Andersen e Albertini, 1976), enquanto que nos ovários dos insectos tomavam parte, possivelmente, na coordenação da diferenciação do complexo oócito--célula folicular (Huebner, 1981).

Bilinski e Klab (1982) evidenciaram, nos ovários do insecto *Acerentomon sp.*, a presença destas junções entre as células foliculares e o oócito durante a pré-vitelogénese e a vitelogénese primária.

A descoberta deste tipo de canais de comunicação nos ovários dos mamíferos, insectos e moluscos, dá a indicação de que este tipo de ligação é bastante comum no mundo animal.

Existem ainda na membrana de algumas células canais implicados no transporte do ião sódio, e cuja formação é influenciada pelos esteróides (entre estes os gluco e os mineralocorticóides). Segundo Sellin e DeSoignie (1985), estes compostos aumentavam a absorção de Na^+ e dos fluídos numa grande variedade de epitélios, entre os quais os do cólon proximal e distal do coelho. Ambas as classes de esteróides aumentavam a actividade da bomba de sódio, sendo no entanto mais efectivo o efeito da aldosterona na entrada de Na^+ pelo polo apical da célula.

Anteriormente Lewis (1983), num estudo da acção da aldosterona no controlo da absorção do Na^+ e da água através dos epitélios "apertados" dos vertebrados, tinha estabelecido que o efeito primário desta hormona seria o de aumentar a permeabilidade a este ião, ou pela activação de imediato de canais já existentes na membrana face ao lúmen (apical), ou pela incorporação de novos canais sintetizados após exposição prolongada à hormona. Outro efeito seria também o aumento da síntese da enzima ATPase Na^+-K^+ responsável pela retirada de Na^+ do citoplasma da célula para a corrente sanguínea.

A epiderme dos moluscos é actualmente considerada uma estrutura dinâmica comprometida com um grande número de processos de transporte activo e passivo (Machin, 1976), apresentando as células que constituem este epitélio características estruturais idênticas às apresentadas pelos epitélios de transporte, já bem estudados. Trabalhos efectuados na brânquia e no manto (Kawaguki e Ykemoto, 1962) de lamelibrânquios puseram em evidência essas características estruturais, o que aliás era

de prever, sobretudo para o manto, claramente implicado na formação da concha.

Uma junção típica das células do epitélio dos moluscos consiste numa *zonula adherens* apical, seguida de uma zona septada localizada logo abaixo (Locke, 1955). Esta disposição permite que uma parte das membranas das células tenham canais de comunicação entre si, com a excepção da *macula adherens*, situada perto da base (Machin, 1975). Resultados obtidos a partir de medições feitas com isótopos (Istin e Maetz, 1964) e resultados de estudos electrofisiológicos (Istin e Kirschner, 1968) em lamelibrânquios de água doce, mostraram que o manto destes animais era altamente permeável ao cálcio, sendo assim criado um efluxo passivo deste ião que gerava aparentemente um potencial eléctrico positivo para o lado extrapaleal. A partir de estudos ultra-estruturais da distribuição do cálcio no epitélio do manto de *Mercenaria*, Neff (1972) interpretava os resultados dando ênfase à via intercelular para a passagem deste ião, consistente com o modelo proposto por Frömter e Diamond (1972) para os epitélios dos vertebrados. Concluiu assim aquele autor que muito do cálcio passava através do epitélio do manto sob a forma ionizada solúvel, percorrendo este caminho entre as células epiteliais.

Parvaznik et al. (1977) descreveram no epitélio da brânquia de *Aplysia* a existência de junções "gap" septadas, e ainda de outras estruturas também constituídas por agrupamentos de partículas, mas de forma irregular. Segundo Quick e Johnson (1977), estes grupos de partículas não estabeleciam ligações entre células adjacentes, como acontecia nas junções "gap", mas seriam responsáveis pelos mecanismos de transmissão química (nervo - célula muscular).

Portanto os epitélios de transporte dos moluscos apresentam também junções intercelulares e canais nas membranas celulares responsáveis pela permeabilidade a certos compostos, e que são regulados pela presença de factores, possivelmente hormonas.

Como no Cap. I caracterizámos a presença de esteróides endógenos em *Mytilus*, no Cap. II demonstrámos a variação de alguns deles ao longo do ciclo reprodutivo, quer no animal inteiro quer nos mantos

isolados, e no Cap. III pusemos em evidência uma variação na permeabilidade dos epitélios do manto ao sódio e ao manitol, também ao longo do ciclo reprodutivo, pensámos que seria oportuno ensaiar a acção *in vitro* dos esteróides e, concretamente, da progesterona e dos estrogénios (estradiol e estrona) na face exterior dos dois epitélios do manto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo falaremos sobre os fluxos de descarga ("wash-out") medidos após um contacto prévio prolongado do manto com o indicador radioactivo, e na presença e ausência (controlo) das hormonas esteróides **progesterona, estradiol** e **estrona.**

ESTUDO CINÉTICO DOS MOVIMENTOS DE SÓDIO E MANITOL - MEDIDA DOS FLUXOS DE DESCARGA ("WASH-OUT")

Cada fragmento do manto foi fixado entre duas câmaras, segundo o esquema clássico usado para o estudo *in vitro* do transporte de iões através dos epitélios, como já foi anteriormente descrito no Capítulo III (ver Materiais e Métodos).

O volume das soluções, medido para cada uma das câmaras, foi de 3,5 ml. O radioisótopo (^{22}Na ou ^{14}C-manitol) foi adicionado a cada câmara no tempo zero e na concentração de 1,87 µCi (para o ^{22}Na), ou de 1,5 µCi (para o ^{14}C-manitol).

Para cada animal foram montados dois sistemas de câmaras: um sistema para um dos mantos, usado como controlo, e outro sistema para o outro manto, submetido à acção das hormonas.

Também no tempo zero foram adicionados 10 µl da solução etanólica 7 mM de progesterona, de estradiol, ou de estrona. Cada face do manto (cavidade paleal e cavidade extrapaleal) ficou em contacto com a hormona, na concentração final de 2×10^{-7} M. As câmaras que contactavam com ambas as faces do manto-controlo foram adicionados 10 µl de etanol absoluto.

Após um período longo de incubação, cerca de 13 h, o elemento do qual se pretendia estudar as trocas encontrava-se suficientemente marcado no interior do tecido.

As soluções foram então substituídas nas duas câmaras por soluções

de composição idêntica, mas sem marcador radioactivo (soluções frias). Em cada uma destas operações foi sempre adicionado o mesmo volume (10 µl) da solução da hormona ou de etanol (controlo). Estas operações foram renovadas de um modo contínuo e com um débito suficiente, permitindo comparar as duas câmaras a um compartimento de tamanho infinito. Com esta condição os fluxos de retorno radioactivo para o tecido foram desprezáveis.

A radioactividade que apareceu em cada uma das câmaras foi então seguida em função do tempo. A evolução das curvas de radioactividade forneceu uma informação sobre a acção destes compostos na permeabilidade dos epitélios do tecido.

Os cálculos utilizados na obtenção dos coeficientes de permeabilidade - K_{21} e K_{23} - dos compartimentos lentamente renovável (CLR) e rapidamente renovável (CRR), o período de renovação dos compartimentos ($K_{21}+K_{23}$) assim como o período biológico ($T_{1/2}$), foram também já descritos no Capítulo III (Materiais e Métodos).

RESULTADOS

A - EFEITO DA PROGESTERONA

1 - SÓDIO

O efeito da progesterona (2×10^{-7} M) na permeabilidade ao sódio de ambas as faces do tecido foi testado segundo o método anteriormente descrito. Dada a rapidez do tempo de renovação do compartimento rapidamente renovável para este ião, traduzida numa grande imprecisão na medida dos coeficientes de permeabilidade, apenas foi quantificado o efeito da hormona nos coeficientes de permeabilidade relativos ao compartimento mais lentamente renovável.

Os resultados obtidos para o conjunto das experiências efectuadas mostram que o efeito desta hormona sobre os valores de ambos os coeficientes de permeabilidade não é significativamente diferente de zero, -18% ± 26 para K_{21} (face à cavidade paleal) e de -25% ± 26 para K_{23}) (face à cavidade extrapaleal).

Apresentando porém os resultados em função do índice da espessura dos mantos (Fig. 1), verifica-se que para valores médios deste índice a hormona tem um efeito negativo mais acentuado sobre o valor dos coeficientes de permeabilidade.

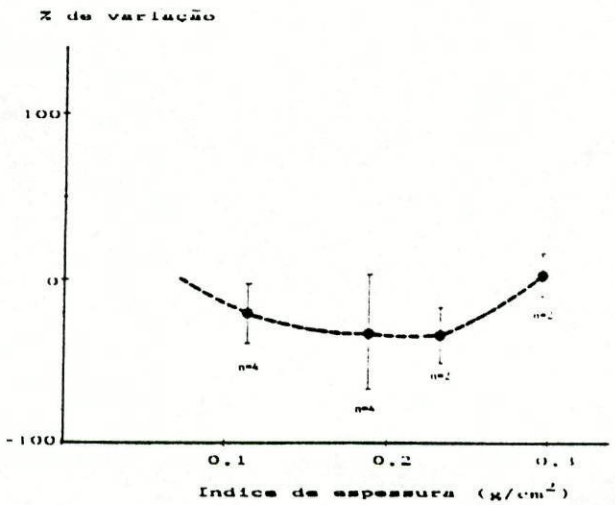


FIG. 1 - Percentagem da variação dos coeficientes de permeabilidade dos dois epitélios do manto ao sódio, pela acção da progesterona, em função do índice da espessura

Procurando pôr em evidência o efeito percentual da hormona em função do valor dos coeficientes de permeabilidade das experiências controlo (Fig. 2), verifica-se que os pontos que representam a variação de K_{ij} se dispoem segundo rectas de inclinação idêntica e aproximadamente equidistantes. A inclinação destas rectas é positiva e a distância entre a sua intercecção com o eixo das ordenadas é de cerca de 0,001 min^{-1}.

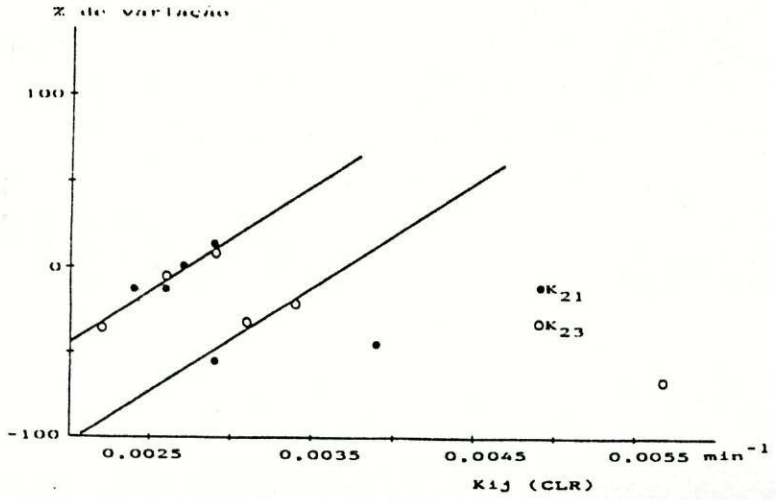


FIG. 2 - Percentagem da variação dos coeficientes de permeabilidade dos dois epitélios do manto ao sódio, pela acção da progesterona, em função do valor absoluto dos fluxos

2 - MANITOL

Foram analisados em conjunto os efeitos da hormona sobre os coeficientes de permeabilidade (K_{21} e K_{23}) dos dois compartimentos.

O resultado global deste efeito no conjunto das experiências não nos dá qualquer indicação precisa. O valor médio da variação percentual dos fluxos devido ao contacto da hormona é de -14 para o K_{21} e +24 para o K_{23}, mas os desvios-padrão das médias são muito elevados (58 e 64, respectivamente), não sendo pois os resultados obtidos significativamente diferentes de zero.

A variação do efeito da progesterona em função do índice da espessura do manto (Fig. 3) permite contudo verificar que:

- nas condições testadas existe sempre um efeito sobre a permeabilidade de ambas as faces do tecido (e em ambos os compartimentos);

- confirma-se que o efeito é semelhante no que respeita aos valores de K_{ij} correspondentes a ambos os compartimentos, o que reforça o facto de ambos os compartimentos estarem separados do exterior pela mesma barreira (ver Cap. III);

- o efeito da hormona sobre K_{21} e K_{23} é sempre de sinal contrário (quando um aumenta o outro diminui) e parece ser variável com o índice da espessura do manto.

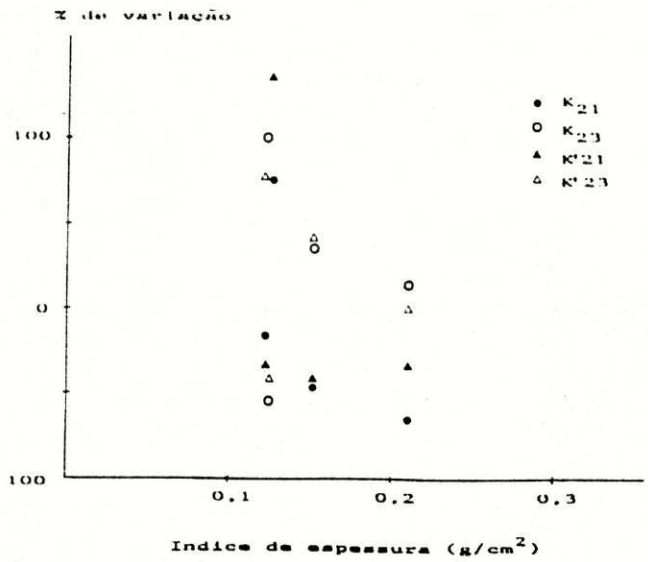


FIG. 3 - Percentagem da variação dos coeficientes de permeabilidade dos dois epitélios do manto ao manitol, pela acção da progesterona, em função do índice da espessura

Observando a variação percentual de K_{ij}, devido à acção da hormona, em função do valor absoluto de K_{ij} (Fig. 4 e 5), pode ainda concluir-se que, tal como ocorria relativamente ao sódio, os pontos que se obtêm agrupam-se em rectas, neste caso com uma inclinação negativa.

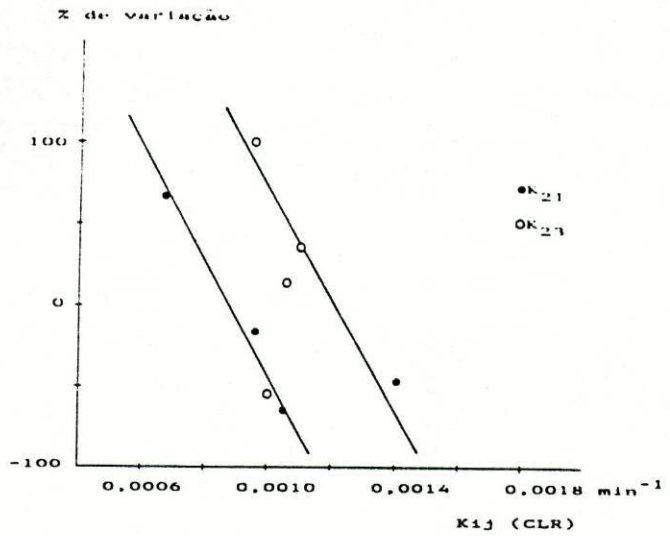


FIG. 4 - Percentagem da variação dos coeficientes de permeabilidade dos dois epitélios do manto ao manitol, referente ao compartimento lentamente renovável, pela acção da progesterona, em função do valor absoluto dos fluxos

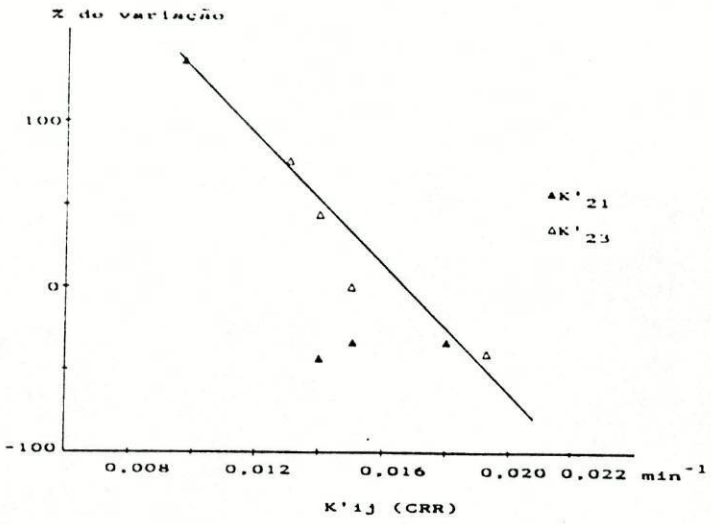


FIG. 5 - Percentagem da variação dos coeficientes de permeabilidade dos dois epitélios do manto ao manitol, referente ao compartimento rapidamente renovável, pela acção da progesterona, em função do valor absoluto dos fluxos

B - EFEITO DOS ESTROGÉNIOS

1 - SÓDIO

O efeito do estradiol (2×10^{-7} M) sobre os fluxos unidireccionais de sódio não produziu resultados conclusivos. Obtiveram-se estimulações

e inibições da mesma ordem de grandeza, sem que tenha sido possível encontrar qualquer relação entre os valores obtidos.

A análise, em função do índice da espessura, dos efeitos do estradiol (2×10^{-7} M) sobre os fluxos de "wash-out" apresenta igualmente resultados contraditórios, difíceis de interpretar. A relação entre os efeitos pencentuais da hormona sobre os fluxos de descarga em função do valor absoluto destes, apesar dos resultados fragmentários que foi possível obter, permite, contudo, verificar o alinhamento de alguns pontos que parecem definir rectas cuja inclinação tem um valor negativo (Fig. 6).

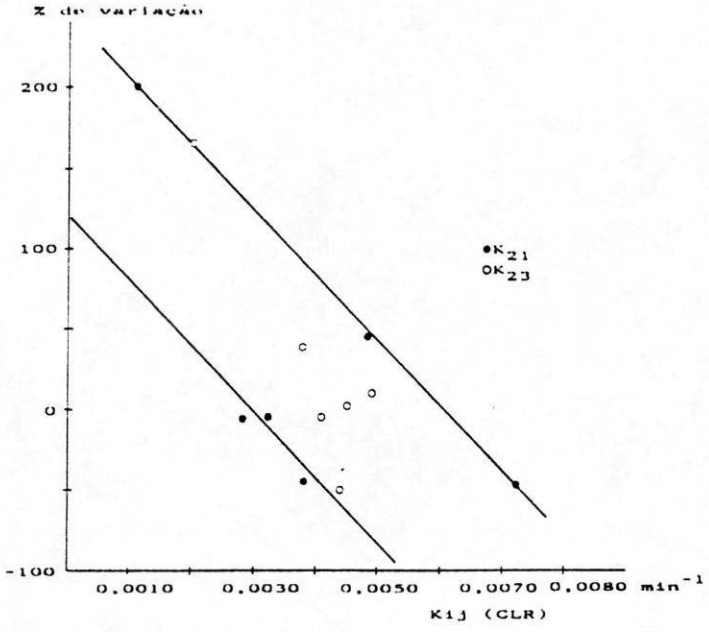


FIG. 6 - Percentagem da variação dos coeficientes de permeabilidade dos dois epitélios do manto ao sódio, referente ao compartimento lentamente renovável, pela acção do estradiol, em função do valor absoluto dos fluxos

2 - MANITOL

O efeito dos estrogénios (estradiol e estrona) na mesma concentração (2×10^{-7} M) sobre os fluxos de "wash-out" de manitol apresenta valores positivos e negativos. Contudo, a relação das variações percentuais encontradas nos fluxos com o índice de espessura dos mantos (Fig. 7) parece indicar que, para valores médios deste índice (entre 0,140 e 0,190), o contacto prévio das hormonas com o tecido conduz a uma diminuição marcada dos fluxos. Para os restantes valores do índice os

resultados apresentam valores médios, que não diferem significativamente de zero.

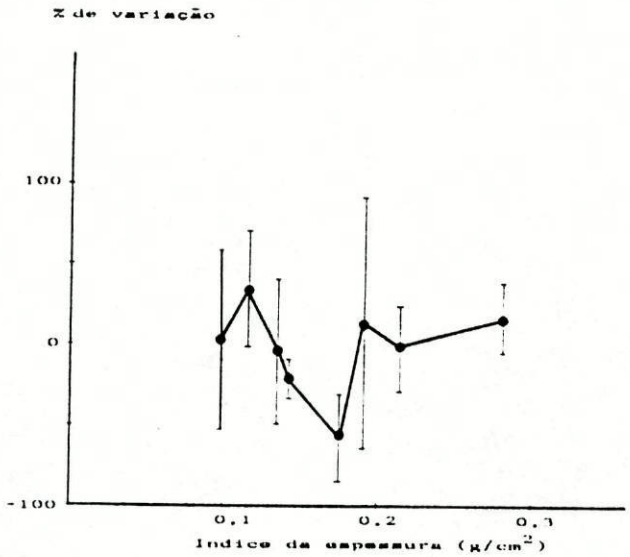


FIG. 7 - Percentagem da variação dos coeficientes de permeabilidade dos dois epitélios do manto ao manitol, pela acção do estradiol e estrona, em função do índice da espessura

A relação dos valores percentuais da variação dos fluxos de descarga com o valor absoluto dos respectivos fluxos (Fig. 8 e 9) permite verificar, de novo, para estas hormonas, o agrupamento dos resultados em linhas rectas de inclinação negativa.

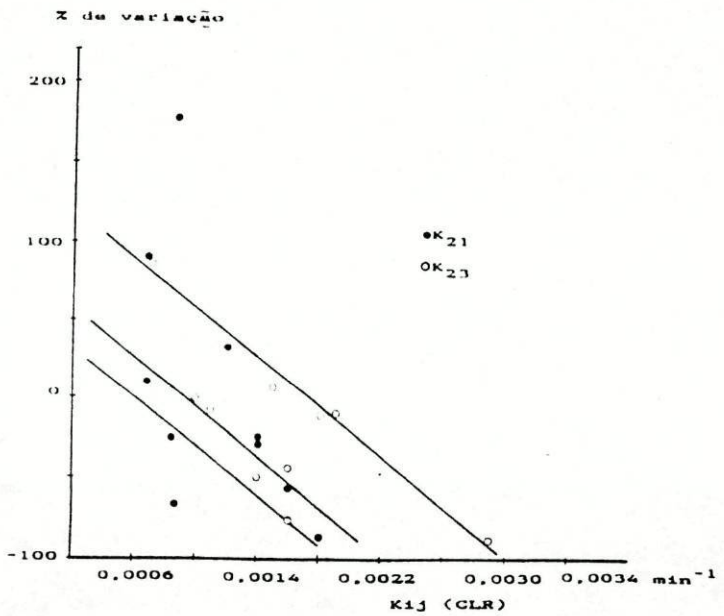


FIG. 8 - Percentagem da variação dos coeficientes de permeabilidade dos dois epitélios do manto ao manitol, referente ao compartimento lentamente renovável, pela acção do estradiol e estrona, em função do valor absoluto dos fluxos

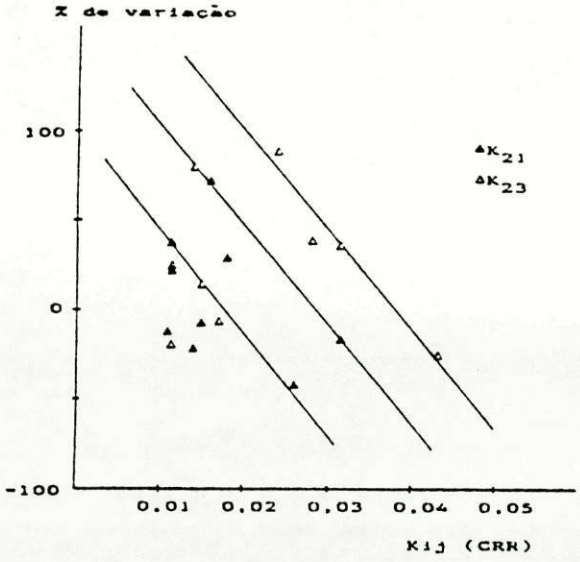


FIG. 9 - Percentagem da variação dos coeficientes de permeabilidade dos dois epitélios do manto ao manitol, referente ao compartimento rapidamente renovável, pela acção do estradiol e estrona, em função do valor absoluto dos fluxos

DISCUSSÃO

Os valores dos fluxos unidireccionais de sódio e de manitol obtidos no Cap. III para cada fase do ciclo reprodutivo permitiram concluir que:

- Durante as primeiras fases de desenvolvimento da gónada (de 0 para d_1 e d_2) deu-se um decréscimo acentuado no valor dos fluxos de sódio, a que se seguiu um aumento dos fluxos de manitol até à fase d_3. A estas fases do ciclo correspondeu a ocorrência de um máximo para os estrogénios.

- No início da regressão da gónada (de d_3 e d_4 para s_3 e s_2) deu-se uma diminuição dos fluxos de manitol, a que se seguiu, até à fase 0, um aumento dos fluxos de sódio. A estas fases do ciclo correspondeu no início um pico de progesterona, acompanhado na fase final (s_2) de um pequeno máximo de estrogénios (ver fig. 65 - Cap. III).

O ensaio do efeito *in vitro* de estrogénios e de progesterona referido neste capítulo permitiu mostrar, em primeiro lugar, que estas hormonas estão envolvidas nas variações de permeabilidade acima referidas.

A escolha do manitol e do sódio para testar o efeito das hormonas na permeabilidade dos dois epitélios do manto residiu no facto de:

- O manitol ter vindo a ser utilizado como um indicador da via paracelular, apesar de ser hoje claro que, tal como outros indicadores mais frequentemente utilizados, é susceptível de atravessar as membranas celulares, embora em percentagem reduzida (O'Donnell e Maddrell, 1983).

- O sódio ser o catião extracelular mais importante, o único para o qual, até ao presente, foi posto em evidência um mecanismo de transporte activo no manto (Machado, 1987), e sobre o qual existem referências a um efeito de certos esteróides (aldosterona) sobre a activação e síntese *de novo* de canais na membrana

das células (Lewis, 1983), embora noutro material biológico (tubo distal do rim).

Dado que os fluxos unidireccionais representam o somatório de vários fluxos, conduzindo a resultados pouco esclarecedores, tornou-se necessário testar os efeitos das hormonas referidas sobre os fluxos de descarga, os quais dizem respeito apenas à barreira que separa o tecido de cada uma das câmaras, no decurso dos estudos *in vitro*.

As indicações obtidas no capítulo anterior, a partir dos valores dos fluxos de descarga, permitiram desde logo concluir que os dois compartimentos tecidulares postos em evidência trocavam com o exterior quer o manitol quer o sódio, possivelmente através da mesma barreira. O facto do efeito dos estrogénios e da progesterona sobre os coeficientes de permeabilidade relativos a ambos os compartimentos ser semelhante, vem reforçar esta hipótese.

O estudo do efeito destas hormonas nos fluxos de descarga permitiu pôr em evidência não só um efeito sobre a intensidade dos fluxos, nalguns casos positivo noutros negativo, como também, dado o rigor com que é possível calcular por este método os coeficientes de permeabilidade (K_{ij}), proceder à sua quantificação.

A concentração de cada hormona utilizada (2×10^{-7} M) e o tempo prévio de contacto desta com o tecido (24 horas) foram idênticos aos utilizados por Katzenellenbogen e Gorski (1972) e Sellin e DeSoignie (1985), embora noutros tecidos biológicos (útero e cólon distal, respectivamente), que permitiram pôr em evidência um efeito sobre a síntese proteica.

O efeito, tanto da progesterona como do estradiol, sobre os fluxos de sódio e de manitol parece estar dependente do estado fisiológico do animal (ou da fase em que se encontra), o que poderá traduzir-se pelo nível de hormonas endógenas existentes no manto. Foi ainda visível, na maior parte dos casos, um certo antagonismo entre os efeitos da progesterona e os dos estrogénios, o que está de acordo com os dados conhecidos sobre a acção da progesterona sobre os receptores citoplasmáticos dos estrogénios e os da própria progesterona (Hsueh et al., 1975), e ainda dos estrogénios sobre os próprios receptores e sobre os recep-

tores da progesterona (Vu Hai et al., 1976; Alonso et al., 1981).

O agrupamento dos pontos, segundo rectas paralelas, correspondentes à variação percentual dos diversos coeficientes de permeabilidade em função do valor destes, pela acção das hormonas, poderá significar que este efeito estará efectivamente dependente do estado fisiológico em que o animal se encontra.

O valor da permeabilidade da membrana varia ao longo do ciclo, entre dois pontos correpondentes à intercepção das referidas rectas com o eixo das ordenadas.

A presença da hormona exógena teria como efeito apressar a conclusão do ciclo. Caso esta hipótese fosse correcta, o valor dos coeficientes de permeabilidade após a acção hormonal deveria situar-se próximo de cada um dos pontos extremos do ciclo, sendo o valor médio de cada grupo muito próximo do valor da intercepção da recta com o eixo das ordenadas. É de facto o que se verifica ao analisar os resultados referentes aos valores das percentagens de variação dos coeficientes de permeabilidade.

Passando a analisar o efeito de cada uma das hormonas, deve ser posto em evidência que:

- A progesterona teve sobre os fluxos de sódio um efeito aparentemente contrário ao dos estrogénios. Parece igualmente claro que o seu efeito foi predominantemente inibitório da permeabilidade ao sódio para valores do índice de espessura próximos de 0,23 (entre 0,20 e 0,25, aproximadamente). Existe uma forte probabilidade de que este valor corresponda a animais nas fases d_4 ou s_3 (ver quadro 11 - Cap. III).

- A progesterona e os estrogénios parecem ter um efeito semelhante sobre os fluxos de manitol, se se observar a variação percentual em função do valor dos coeficientes de permeabilidade. Contudo, ao analisar essa acção em função do índice de espessura verificou-se, para os estrogénios, um efeito marcadamente inibitório sobre a permeabilidade ao manitol para índices de valores compreendidos entre 0,14 e 0,18, que corresponderiam a animais nas

fases d_1, d_2 e d_3 (ver quadro 11 - Cap. III).

Relativamente à progesterona, pode verificar-se uma acção aparentemente contrária sobre os dois epitélios, e ainda a ocorrência de uma estimulação para valores do índice de espessura proóximos de 0,12-0,13, a que corresponderiam animais predominantemente nas fases s_1 e s_2.

É ainda de realçar que o efeito máximo de ambas as hormonas ocorreu aparentemente nas fases em que ocorreram igualmente níveis mais elevados da hormona endógena.

Não é fácil, apenas com estes dados obtidos, tirar conclusões sólidas sobre os mecanismos de acção destas hormonas no que respeita ao seu efeito sobre a permeabilidade do manto ao sódio e ao manitol, usados como indicadores da via paracelular. É contudo curioso verificar que a permeabilidade dos epitélios parece variar ao longo do ciclo reprodutivo, sob a acção hormonal, entre valores extremos aparentemente múltiplos de um valor fixo. Terá este facto a ver com a existência de um número fixo de receptores para as hormonas que se vai multiplicando?

BIBLIOGRAFIA

ALONSO, G.E., BURDMAN, J.A. and SZIJAN, I. (1981). Studies on estrogen receptors in the cytosol and nuclei of the rat anterior pituitary gland. Determination of specific sites by $|^{3}H|$-estradiol exchange assay. *J. Ster. Biochem.* **14**: 1285-1291.

ANDERSON, E. and ALBERTINI, D.F. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.* **71**: 680-686.

BILIŃSKI, S. and KLAG, J. (1982). Gap junctions between oocyte and follicle cells in *Acerentomon* sp. *(Insecta, Protura). Int. J. Invert. Reprod.* **5**: 331-335.

BURGHARDT, R.C. and ANDERSON, E. (1979). Hormonal modulation of ovarian intertitial cells with particular reference to gap junctions. *J. Cell Biol.* **81**: 104-114.

COLE, W.C., GARFIELD, R.E. and KIRKALDY, J.S. (1983). Increases gap junctions area improves cell-to-cell diffusion ^{3}H-2-deoxyglucose between uterine smooth muscle cells. *Biophys. J.* **41**: 84A.

CURRAN, P.F. (1960). NaCl and water transport by rat ileum *in vitro*. *J. Gen. Physiol.* **43**: 1137-1148.

DAHL, G. and BERGER, W. (1978). Nexus formation in the myometrium during parturition and induced by estrogens. *Cell Biol. Int. Rep.* **2**: 377-381.

DEWEY, M.M. and BARR, L. (1962). Intercellular connection between smooth muscle cells: the nexus. *Science* **137**: 670-672.

ELIAS, E., IQBAL, S. and COLEMAN, R. (1983). Increased tight junction permeability: a possible mechanism of oestrogen cholestasis. *Eur. J. Clin. Invest.* **13**: 383-390.

ELIAS, P.M. and FRIEND, D.S. (1976). Vitamin A - induced mucous metaplasia. *J. Cell Biol.* **68**: 173-188.

FRÖMTER, E. and DIAMOND, E.J. (1972). Route of passive ion permeation epithelia. *Nature, Lond.* 235: 9-14.

GARFIELD, R.E., KANNAN, M.S. and DANIEL, E.E. (1980). Gap junction formation in myometrium: control by estrogens, progesterone and prostaglandins. *Am. J. Physiol.* 238: 81-89.

HERTZBERG, E.L., LAWRENCE, T.S. and GILLULA, N.B. (1981). Gap junctional communication. *Ann. Rev. Physiol.* 43: 479-491.

HSUEH, A.J.W., PECK, E.J. and CLARK, J.H. (1975). Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. *Nature* 254: 337-339.

HUEBNER, E. (1981). Oocyte-follicle cell interaction during normal oogenesis and atresia in an insect. *J. Ultrastruct. Res.* 74: 95--104.

ISTIN, M. and MAETZ, J. (1964). Permeabilité au calcium du manteau de lamellibranches d'eau douce étudiée à l'aide des isotopes ^{45}Ca e ^{47}Ca. *Biochem. Biophys. Acta* 88: 225-227.

ISTIN, M. and KIRSCHNER, L.B. (1968). On the origin of the bioelectrical potencial generated by the freshwater clam mantle. *J. Gen. Physiol.* 51: 478-496.

KATZENELLENBOGEN, B.S. and GORSKI, J. (1972). Estrogen action *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 25: 1299-1305.

KAWAGUTI, S. and IKEMOTO, N. (1962). Electron microscopy on the mantle of a bivalve *Fabulina nitidula*. *Biol. J. Okayama Univ.*, 8: 31-42.

LEWIS, S.A. (1983). Control of Na^+ and water absorption across vertebrate "tight" epithelia by ADH and aldosterone. *J. Exp. Biol.* 106: 9-24.

LOEWENSTEIN, W.R. (1979). Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem. Biophys. Acta* 560: 1-65.

LOEWENSTEIN, W.R. (1981). Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.*, 61: 829-913.

MACHADO, J.P., COIMBRA, J., FERREIRA, K.G. and FERREIRA, H.G. (1987). Ion transport across the outer epithelium of the mantle of *Anodonta cygnea* and shell formation. Em publicação.

MACHIN, J. (1977). In *Transport of ions and water in animals*, pp. 735--761. Academic Press. New York.

MACKENZIE, L.W., PURI, C.P. and GARFIELD, R.E. (1983). Effect of estradiol-17β and prostaglandins on rat myometrial gap junctions. *Prostaglandins* **26**: 925-941.

MCGINLEY, D. POSALAKY, Z., PORVAZNIK, M. and RUSSEL, L. (1979). Gap junctions between Sertoli and green cells of rat seminiferous tubules. *Tissue Cell* **11**: 741-754.

NEFF, J.M. (1972). Ultrastructure of the outer epithelium of the mantle in the clam *Mercenaria mercenaria* in relation to calcification of the shell. *Tissue and Cell* **4**: 591-600.

O'DONNEL, M.J. and MADDRELL, S.H.P. (1983). Paracellular and transcellular routes for water and solute movements across insect epithelia. *J. Exp. Biol.* **106**: 231-253.

OSA, T. and OGASAWARA, T. (1984). Changes in the adrenergic effects and membrane activity of the circular muscle of rat uterus during late pregnancy and post partum. *Jpn. J. Physiol.* **34**: 113-126.

PRESCOTT, L. and BRIGHTMAN, M.W. (1976). The sarcolemma of *Aplysia* smooth muscle in freeze-fracture preparations. *Tissue and Cell* **8**: 241-258.

QUICK, D.C. and JOHNSON, R.G. (1977). Gap junctions and rhombic particle arrays in *Planaria*. *J. Ultrastruct. Res.* **60**: 348-361.

REVEL, J.P., NICHOLSON, B.J. and YANCEY, S.B. (1985). Chemistry of gap junctions. *Ann. Rev. Physiol.* **47**: 263-279.

ROSE, B. and LOEWENSTEIN, W.R. (1970). Junctional membrane permeability. Depression bu substitution of Li for extracellular Na and by long-term lack of Ca and Mg; restoration by cell repolarization. *J. Membr. Biol.* **5**: 20-50.

ROSE, B. and LOEWENSTEIN, W.R. (1975). Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic calcium activity. *Nature* **254**: 250--252.

SALEUDIN, A.S.M., WILSON, L.E., KHAN, H.R. and JONES, G.M. (1980). Effects of brain extracts on oocyte maturation in *Helisoma* (Pulmonata: Mollusca). *Can. J. Zool.* **58**: 1109-1124.

SCHWARTZMANN, G. WIEGANDT, H. ROSE, B. ZIMMERMAN, A. BEN-HAIM, D. and LOEWENSTEIN, W.R. (1981). Diameter of the cell-to-cell junctional membrane channels as probed with neutral molecules. *Science* **213**: 551-553.

SELLIN, J.H. and DESOIGNIE, R.C. (1985). Steroids alter ion transport and absorptive capacity in proximal and distal colon. *Americ. J. Physiol.* **249**: 113-119.

SIMIONESCU, M., SIMIONESCU, N. and PALADZ, G. (1975). Segmental variations of cell junctions in the vascular endothelium: the microvasculature. *J. Cell Biol.* **67**: 863-885.

SIMS, S.M., DANIEL, E.E. and GARFIELD, R.E. (1982). Improved electrical coupling in uterine smooth muscle is associated with increased numbers of gap junctions at parturition. *J. Gen. Physiol.* **80**: 353--375.

SÖLIÖSI, A. and MARCAILLOU, C. (1980). Gap junctions between germ and somatic cells in the testes of the moth, *Anagasta küehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Cell Tissue Res.* **213**: 137-147.

VU HAI, M.T., LOGEAT, F., WAREMBOURG, M. and MILGROM, E. (1976). Hormonal control of progesterone receptors. *Annals New York Acad. Sci.*: 199-209.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos ao longo do trabalho, e apresentados nos capítulos precedentes, permitem tirar um certo número de conclusões, a primeira das quais é, sem dúvida, **a presença em *Mytilus* sp. dos esteróides endógenos: progesterona, Δ^4-androstenediona, testosterona, diidrotestosterona, estradiol, estrona, androsterona e androstanediol.**

Os níveis de progesterona, testosterona e estrona encontrados no animal inteiro são da mesma ordem de grandeza dos que são referidos para os animais superiores. Foi ainda possível demonstrar que uma fracção importante dos referidos esteróides se encontra na gónada destes animais. Um aspecto igualmente importante reside no facto de, ao contrário do que sucede nos vertebrados, não existirem diferenças significativas entre os níveis de estrogénios e de progesterona entre machos e fêmeas. Em ambos os sexos os níveis destes esteróides variam fortemente ao longo do ano, permitindo o estudo da sua variação demonstrar que:

- os máximos de **progesterona** aparecem sobretudo no Verão, correspondendo a épocas que precedem a emissão dos gâmetas;
- os níveis de **estradiol** mostram dois valores máximos, um em Maio e outro em Novembro, correspondendo principalmente a fases de desenvolvimento sexual;
- a **estrona** tem um padrão idêntico ao do estradiol, apresentando contudo um máximo mais evidente no Verão, em que 50% dos animais se encontram numa fase de redesenvolvimento.

A correlação dos reseultados referentes à medida dos níveis de cada um destes esteróides com os dados obtidos pelo exame histológico das gónadas, permite chegar a conclusões mais precisas sobre a evolução dos níveis de estrogénios e da progesterona nas diversas fases do ciclo reprodutivo.

Assim, **foi possível estabelecer para a progesterona um máximo entre a postura e o repouso sexual (sobretudo na fase s_3) e para os**

estrogénios dois máximos, o primeiro, mais importante, no período inicial do desenvolvimento da gónada (sobretudo na fase d_1) e o segundo, de menos amplitude, no período de redesenvolvimento (na fase s_2), coincidindo com a ocorrência de níveis igualmente elevados de progesterona. Este padrão apresenta alguma analogia com o que está descrito para as fêmeas dos vertebrados.

Relativamente ao conjunto da população, a distribuição das diversas fases do ciclo reprodutivo ao longo do ano integra-se no padrão descrito para os animais deste grupo que habitam os climas temperados, com **posturas parciais na Primavera e uma postura plena no Verão.** Existe também nestes animais uma correlação estreita entre a evolução do ciclo reprodutivo e um certo número de outros parâmetros fisiológicos como, por exemplo, os níveis de **lípidos totais,** de que foi possível confirmar a existência de um máximo no Outono e Inverno, a que correspondem fases de desenvolvimento mais avançadas.

Um outro parâmetro cuja variação foi posta em evidência foi a **permeabilidade dos epitélios do manto** ao sódio, ao cálcio e ao manitol, este utilizado aqui como indicador da via paracelular.

Os resultados relativos aos fluxos de **sódio** e de **manitol** através da totalidade do manto (fluxos unidireccionais dirigidos para a cavidade extrapaleal) mostram que:

- os valores obtidos não diferem muito daqueles que se encontram na literatura para os fluxos através do manto e também do intestino de outros grupos próximos deste;

- existe uma forte variação sazonal do valor dos fluxos, sendo possível identificar diversos máximos para os fluxos de sódio, dos quais, os mais importantes, se localizam nos meses de **Julho** e **Agosto.** Para os fluxos de manitol o mais importante situa-se em **Junho;**

- **a correlação do valor dos fluxos de sódio com as fases do ciclo reprodutivo mostra que os valores são muito próximos entre si durante as fases de desenvolvimento, aumentando mas fases de postura, com um máximo muito marcado na fase zero (repouso**

sexual);

- **ao contrário do que se passa com o sódio, a correlação entre os fluxos de manitol e as fases do ciclo reprodutivo mostra valores máximos nas fases de desenvolvimento d_3 e d_4, e valores mínimos nas fases de postura.**

A medida dos fluxos de descarga do tecido (do interior do tecido para a cavidade paleal e para a cavidade extrapaleal) permite igualmente mostrar que:

- existem pelo menos **dois compartimentos** no tecido, tanto para o **sódio**, como para o **cálcio**, como para o **manitol**. Este último tem um tempo de renovação muito elevado em relação aos outros dois;

- o tempo de renovação dos dois compartimentos do **sódio** é de 5 min para o compartimento rapidamente renovável (CRR) e de 103 min para o compartimento lentamente renovável (CLR). Para o **cálcio** estes valores são de 5 e 93 min, e para o **manitol** de 23 e 305 min, respectivamente;

- ambos os compartimentos parecem renovar-se a partir de cada uma das faces do tecido através da mesma barreira;

- a permeabilidade de ambas as faces do manto é idêntica entre si tanto para o sódio, como para o cálcio, como para o manitol;

- **a permeabilidade aos iões e ao manitol de ambas as faces do manto varia com as diversas fases do ciclo reprodutivo, havendo uma correlação estreita entre os valores dos coeficientes de permeabilidade e o índice de desenvolvimento da gónada, positiva no caso do manitol, e negativa para o sódio e cálcio.**

As concentrações dos iões Na^+, Ca^{2+} e K^+ evoluem igualmente ao longo do ano, apresentando nos dois primeiros uma correlação negativa com o índice de maturação da gónada, enquanto o K^+, um ião predominantemente intracelular, não apresenta variação significativa.

O efeito *in vitro* da **progesterona, estradiol** e **estrona** sobre os fluxos de descarga do **sódio** e **manitol**, e em doses previamente ensaiadas noutros tecidos, permite concluir que:

- estas hormonas têm entre elas um efeito sobre a permeabilidade de ambos os epitélios do manto ao sódio e ao manitol;

- a **progesterona** tem um efeito predominantemente inibitório sobre os fluxos de sódio, sobretudo para animais nas fases de desenvolvimento máximo. Por seu turno os **estrogénios** apresentam um efeito contrário;

- a **progesterona** e os **estrogénios** apresentam efeitos contrários sobre os fluxos de manitol, sendo o efeito aparentemente dependente da fase em que o animal se encontra.

O conjunto dos resultados do efeito *in vitro* destes esteróides sobre a permeabilidade dos epitélios do manto, apresenta indícios de que:

- **a progesterona e os estrogénios, cujos níveis endógenos oscilam ao longo do ciclo reprodutivo, estão envolvidos nas variações de permeabilidade dos epitélios do manto aos iões e ao manitol (indicador da via paracelular);**

- **a progesterona e os estrogénios apresentam em ambos os casos um efeito antagónico, de acordo com o que está descrito sobre a acção da progesterona sobre os receptores dos estrogénios;**

- **o efeito dos esteróides ensaiados parece estar dependente da fase em que o animal se encontra (níveis de hormonas endógenas);**

- **existem variações descontínuas da permeabilidade dos epitélios que são aparentemente independentes da acção destas hormonas;**

- **existe uma relação estreita entre a regulação hormonal do ciclo reprodutivo e o equilíbrio hidromineral.**

Em resumo:

A apreciação dos resultados obtidos no decurso deste trabalho permite pôr em evidência e presença em *Mytilus* sp. de um número elevado de esteróides (progesterona, androstenediona, testosterona, diidrotestosterona, estradiol, estrona, androsterona e androstanediol), cuja

presença nestes animais era, até à data, apenas afirmada pela existência de enzimas envolvidas no seu metabolismo e cuja presença nos vertebrados superiores tem um significado preciso como hormonas envolvidas na reprodução.

A evolução dos níveis de alguns destes esteróides (progesterona, estradiol e estrona) ao longo do ciclo reprodutivo em *Mytilus* sp. permite mostrar ainda que os estrogénios apresentam um máximo durante as fases de desenvolvimento gametogénico, e outro durante a fase de emissão dos gâmetas, este coincidente com o máximo de progesterona. Tal padrão é em tudo semelhante ao que é conhecido para os vertebrados.

A correlação entre a ocorrência das várias fases do ciclo reprodutivo e a permeabilidade dos epitélios do manto ao sódio, ao cálcio e ao manitol (um indicador da via paracelular) mostra existirem variações marcadas do valor dos fluxos daquelas substâncias, sendo os epitélios mais permeáveis ao sódio e ao cálcio na fase de repouso sexual, e ao manitol nas fases de maior desenvolvimento das gónadas.

O efeito *in vitro* da progesterona, do estradiol e da estrona sobre os fluxos de sódio e de manitol permite mostrar que ambos são sensíveis à presença daqueles esteróides, que têm em regra um efeito antagónico e aparentemente dependente da fase do ciclo reprodutivo em que o animal se encontra. Estes resultados evidenciaram ainda o que parece ser um aumento descontínuo do valor dos fluxos, independente da acção destas hormonas.

Na globalidade estes resultados apontam para uma ligação estreita entre a regulação hormonal do ciclo reprodutivo e a regulação iónica e osmótica nos lamelibrânquios.