

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Estudo *in vitro* da hipófise e testículos de
Astyanax altiparanae
(Characiformes:Characidae) e os
anti-inflamatórios não esteroidais como
desreguladores endócrinos**

Giovana Souza Branco

**Jaboticabal, São Paulo
2020**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Estudo *in vitro* da hipófise e testículos de
Astyanax altiparanae
(Characiformes:Characidae) e os
anti-inflamatórios não esteroidais como
desreguladores endócrinos**

Giovana Souza Branco

Orientadora: Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Co Orientadora: Dra. Maria Inês Borella

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

**Jaboticabal, São Paulo
2020**

Branco, Giovana Souza
B816e Estudo in vitro da hipófise e testículos de *Astyanax altiparanae*
(Characiformes:Characidae) e os anti-inflamatórios não esteroidais como
desreguladores endócrinos / Giovana Souza Branco. -- Jaboticabal, 2020
i, 94 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura,
2020
Orientadora: Renata Guimarães Moreira Whitton
Coorientador: Maria Ines Borella
Banca examinadora: Claudia Bueno dos Reis Martinez, Fabiana Laura Lo
Nostro, Leticia Veras Costa Lotufo, Rosicleire Veríssimo Silveira
Bibliografia

1. Explante de tecidos. 2. Gonadotropinas. 3. GnRH/GnIH. 4. Diclofenaco.
5. Ibuprofeno. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

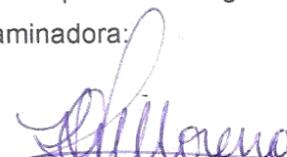
Título: *Estudo in vitro da lipólise e efeitos de Astyanax altiparanae (Characiformes: Characidae) e os anti-inflamatórios não-esteroidais como desreguladores endócrinos.*

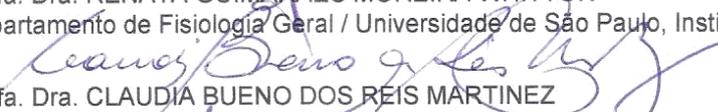
AUTORA: GIOVANA SOUZA BRANCO

ORIENTADORA: RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON

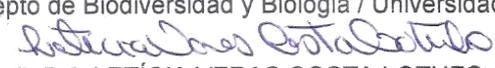
COORIENTADORA: MARIA INÊS BORELLA

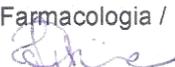
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON
Departamento de Fisiologia Geral / Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências (IB/USP)


Profa. Dra. CLAUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ
Departamento de Ciências Fisiológicas / Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR


Profa. Dra. FABIANA LAURA LO NOSTRO
Depto de Biodiversidad y Biología / Universidad de Buenos Aires, Argentina


Profª. Drª. LETÍCIA VERAS COSTA LOTUFO
Departamento de Farmacologia / Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo-SP


Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP, Ilha Solteira-SP

Jaboticabal, 14 de fevereiro de 2020.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
APOIO FINANCEIRO.....	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO GERAL.....	7
MANUSCRITO 1	17
Effects of GnRH and GnIH in the pituitary explants of <i>Astyanax altiparanae</i> males	18
Abstract.....	18
1. Introduction.....	19
2. Material and methods	21
3. Results.....	25
4. Discussion	26
References.....	30
Figure Legends.....	38
Figures.....	40
MANUSCRITO 2.....	43
Anti-inflamatórios não esteroidais como desreguladores endócrinos na hipófise e testículos de <i>Astyanax altiparanae</i> (Teleostei: Characidae)	44
Resumo.....	44
1. Introdução.....	45
2. Material e Métodos	48
3. Resultados.....	56
4. Discussão	58
5. Conclusão.....	62
Referências.....	63
Legendas das Figuras	69
Figuras e Tabelas	73
DISCUSSÃO GERAL.....	85
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	88

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe Edna Rute de Souza Branco, que além de ser um ser humano maravilhoso de quem eu me orgulho de ser filha e me inspiro, foi a minha maior incentivadora em sempre estudar, não medindo esforços para me dar uma educação de qualidade em toda minha formação, não medindo esforços para me proporcionar uma estrutura pra que eu pudesse ter paz e tranquilidade para seguir o caminho da pós graduação, me motivando e vibrando comigo em todas minhas conquistas. Juntamente com meu pai, Eduardo Ferreira Branco, que sempre me apoiou e pela compreensão nos muitos momentos de ausência familiar.

Agradecer à Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Ao meu marido, Felipe Pontieri de Lima que me apoiou a começar o doutorado e não desistir dele, me dando suporte e me apoiando. Só tenho a dizer muito obrigada por tudo.

As minhas irmãs, Maria Eduarda Souza Branco e Mariana Souza Branco, que me apoiaram e estiveram presentes em várias etapas dessa fase.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton, por ter me dado a oportunidade de concluir o doutorado sob sua orientação, por toda ajuda, apoio, compreensão e confiança.

À minha coorientadora Profa. Dra. Maria Inês Borella, que abriu as portas do seu laboratório mais uma vez pra mim, sempre me ajudando e se preocupando com cada etapa a ser realizada.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Tolussi, por colaborar nos experimentos de exposição aos fármacos.

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega, que me orientou no início do doutorado.

Aos alunos do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) por me ajudarem quando cheguei ao laboratório novo, contribuíram com o meu trabalho, pelas discussões científicas, entre vários outros pontos, sendo eles Aline Dal'Olio Gomes, Marcela Muñoz, Gabriela Brambila, Fernanda Mello, Jenifer Lima de Oliveira, Paulo Mello, Bruno Araújo, Bianca Rangel, Bruno Lima, Cecília Bertacini, Ethiene Fernandes, Filipe Godoi, João Paulo Pinheiro, Natalia Pires e Victor Marques.

Aos alunos do Laboratório de Endocrinologia de Peixes por toda amizade e ajuda nas coletas dos experimentos de exposição aos fármacos, Marília de Paiva Camargo e Gisele C. M. Dias.

Aos alunos do Laboratório do Grupo de Biologia Molecular e Reprodução, pela ajuda nas minhas primeiras análises de Biologia Molecular, Dr. Emanuel Ricardo Monteiro Martinez, Dra. Melanie Digmayer, Arno Juliano Butzge, Juliana Morena Bonita Ricci, Lucas Benites Doretto, Isabella Lívia Dan Della Mura, Ivana Felipe, Aline Gomes Melo, Alecsia Carvalho e Maira da Silva Rodrigues.

Aos técnicos Vagner Alberto, Cruz Alberto Mendoza Rigonati e Valquiria de Oliveira Pereira por toda a ajuda com os peixes, cortes histológicos e compras.

Às professoras Profa. Dra. Estela M. A. F. Bevilacqua, Profa. Dra. Telma Zorn e Profa. Dra. Patrícia Pereira Coltri pela disponibilidade de abrirem a porta de seus laboratórios e permitirem a utilização de seus equipamentos, como o StepOnePlus™ Real-Time PCR System e Nanodrop, para as análises de expressão gênica.

Aos professores Profa. Dra. Elizabeth Romagosa, Prof. Dr. Sergio Batlouni, Profa. Dra. Rosicleire Veríssimo Silveira e Prof. Dr. Alexandre Ninhaus, pela amizade e discussão de dados científicos ao longo desses anos de caminhada científica.

Ao pesquisador Dr. Renato Massaaki Honji e a Profa. Dra. Taís da Silva Lopes, primeiramente pela amizade e por toda a contribuição dada durante a qualificação.

Às minhas amigas que estiveram ao meu lado em muitos finais de semana em SP, Mayara, Cristiane, Barbara, Bruna, Carla, Evelyse, Giovanna, Marcela e Paola, obrigada por tudo.

A todos os funcionários e docentes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Instituto de Ciências Biomédicas I e do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, por toda ajuda e disposição para ajudar, contribuíram muito para minha formação pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), pela oportunidade oferecida e ensinamentos adquiridos.

Aos funcionários do Centro de Aquicultura da UNESP, da Universidade “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal.

A Companhia Energética do Estado de São Paulo (CESP), especialmente ao Danilo Caneppele, Leandro Fernandes Celestino e funcionários da estação de piscicultura de Paraibuna, por toda a ajuda e pelos peixes doados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 2017/11530-1, 2014/16320-7 pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

E por todos aqueles que estiveram presentes durante esse tempo que de uma forma ou de outra colaboraram tanto na execução do trabalho como no dia-a-dia e peço desculpas a quem não foi citado.

APOIO FINANCEIRO

Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos: 2014/07620-7, 2015/12104-0, 2013/20450-0 e 2017/11530-1, 2014/16320-7 pelo financiamento do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG) modula o processo reprodutivo nos vertebrados e pode ser alvo de diversas substâncias que podem de alguma forma alterar a reprodução em diferentes espécies, dentre elas os teleósteos. Em condições favoráveis, ocorre a sinalização do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), produzido e liberado por neurônios hipotalâmicos, que atua nas células gonadotrópicas da adeno-hipófise, estimulando a síntese e liberação do hormônio folículo-estimulante (Fsh) e o hormônio luteinizante (Lh). Esses, por sua vez, chegam às gônadas, promovendo a produção dos esteroides gonadais, maturação e liberação dos gametas. Enquanto o GnRH exerce papéis estimuladores, as ações do GnIH (hormônio inibidor de gonadotropinas) permanecem controversas para muitas espécies de teleósteos. Sabe-se que alguns compostos químicos podem interferir no funcionamento do eixo HHG dos peixes e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) podem atuar como desreguladores endócrinos e afetar a produção das gonadotropinas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* do GnRH e do GnIH, além dos AINEs – diclofenaco e ibuprofeno, na regulação da expressão gênica das gonadotropinas utilizando explantes de hipófise, e o efeitos dos AINEs sob a liberação dos esteroides gonadais em explantes de testículos, de uma espécie neotropical, *Astyanax altiparanae*. Nossos resultados mostraram que o cGnRH2 (*chicken* GnRH2) aumentou os níveis de expressão de *fshb* e *lhb*, e o zGnIH-3 (*zebrafish* GnIH-3) não teve efeito direto sobre a expressão das gonadotropinas. No entanto, o zGnIH-3 diminuiu a expressão de *fshb* e *lhb* induzidos por cGnRH2. Em relação aos efeitos dos AINEs sobre o eixo reprodutivo *in vitro*, tanto o diclofenaco quanto o ibuprofeno foram capazes de inibir a expressão gênica das gonadotropinas e o ibuprofeno diminuiu a liberação de estradiol e testosterona por fragmentos de testículos.

PALAVRAS-CHAVE: explantes de tecidos, gonadotropinas, GnRH/GnIH, diclofenaco, ibuprofeno.

ABSTRACT

The hypothalamus-pituitary-gonads (HPG) axis modulates the reproductive process in vertebrates and may be the target of several substances that may in some way alter reproduction in different species, including teleosts. Under favorable conditions, the gonadotropin releasing hormone (GnRH), produced and released by hypothalamic neurons acts in the adenohypophysis gonadotropic cells stimulates the synthesis and release of the follicle-stimulating hormone (Fsh) and the luteinizing hormone (LH), that act in the gonads promoting the production of gonadal steroids, for maturation and release of gametes. While GnRH exerts stimulatory roles, GnIH (gonadotropin inhibitory hormone) actions remain controversial for many species of teleosts. Some chemical compounds may interfere in the HPG axis in fish, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may act as endocrine disrupters and affect the production of gonadotropins. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* effects of GnRH and GnIH and NSAIDs - diclofenac and ibuprofen - on the regulation of gonadotropins gene expression using pituitary explants and the effects of NSAIDs on the release of gonadal steroids in testicular explants from a Neotropical species, *Astyanax altiparanae*. Our results showed that in males, cGnRH2 (chicken GnRH2) increased the expression levels of *fshb* and *lhb*, and zGnIH-3 (zebrafish GnIH-3) had no direct effect on gonadotropin expression. However, zGnIH-3 stimulated the decrease of the expression of *fshb* and *lhb* induced by cGnRH2. Regarding the effects of NSAIDs on the reproductive axis *in vitro*, diclofenac and ibuprofen were able to decrease the gonadotropin gene expression and ibuprofen decreased the release of estradiol and testosterone by the testicular fragments.

KEYWORDS: tissue explants, gonadotropins, GnRH/GnIH, diclofenac, ibuprofen.

INTRODUÇÃO GERAL

O processo reprodutivo dos peixes resulta da integração de fatores ambientais, como fotoperíodo, temperatura, variação do nível da água, disponibilidade de alimento, salinidade, dentre outros, com as condições fisiológicas adequadas do organismo e estado nutricional (Nagahama, 1994). Sendo assim, em condições favoráveis, neurônios hipotalâmicos sintetizam e secretam o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) que, por sua vez, estimula as células gonadotrópicas da adeno-hipófise a sintetizar e liberar o hormônio folículo-estimulante (Fsh) e o hormônio luteinizante (Lh) (Figura 1). Nos peixes, assim como ocorre em mamíferos, o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG) rege de forma sincrônica o controle geral sobre o desenvolvimento e função gonadal (Schulz *et al.*, 2001).

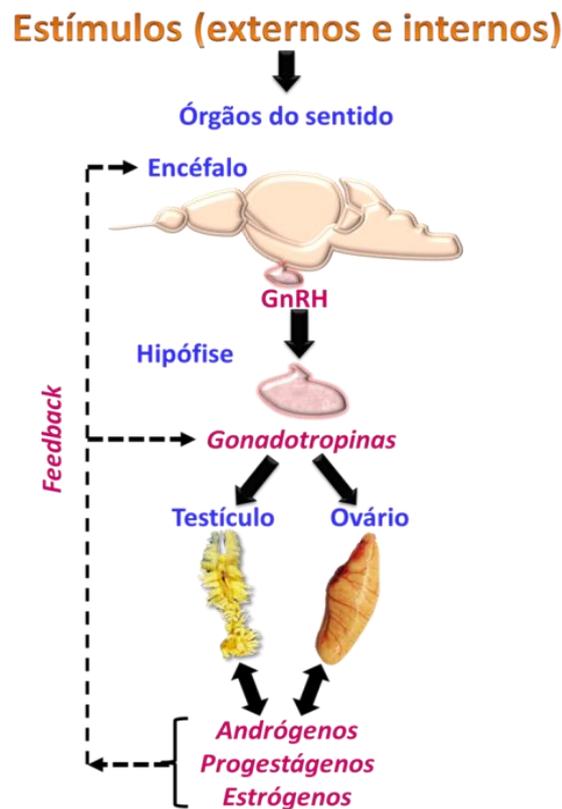


Figura 1: Representação do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas. Estímulos externos e internos são recebidos pelos órgãos do sentido modulando a síntese e liberação do GnRH pelo hipotálamo (no encéfalo), que age na hipófise, onde ocorre a síntese e liberação das gonadotropinas (Fsh e Lh), que por sua vez, atuarão nas gônadas, estimulando a produção de esteroides (andrógenos, progestágenos e estrógenos) (esquema cedido por Nóbrega, R.H.).

Por muito tempo o GnRH foi considerado como o neuro-hormônio situado no topo do eixo HHG, ou seja, ele desencadearia o funcionamento deste eixo, sendo estabelecidas três formas: GnRH1, GnRH2 e GnRH3. O GnRH1 localiza-se principalmente no hipotálamo, o GnRH2 é expresso na região mesencefálica, e o GnRH3 é um grupo específico, exclusivo de teleósteos (White e Fernald, 1998), localizado no telencéfalo (Figura 2).

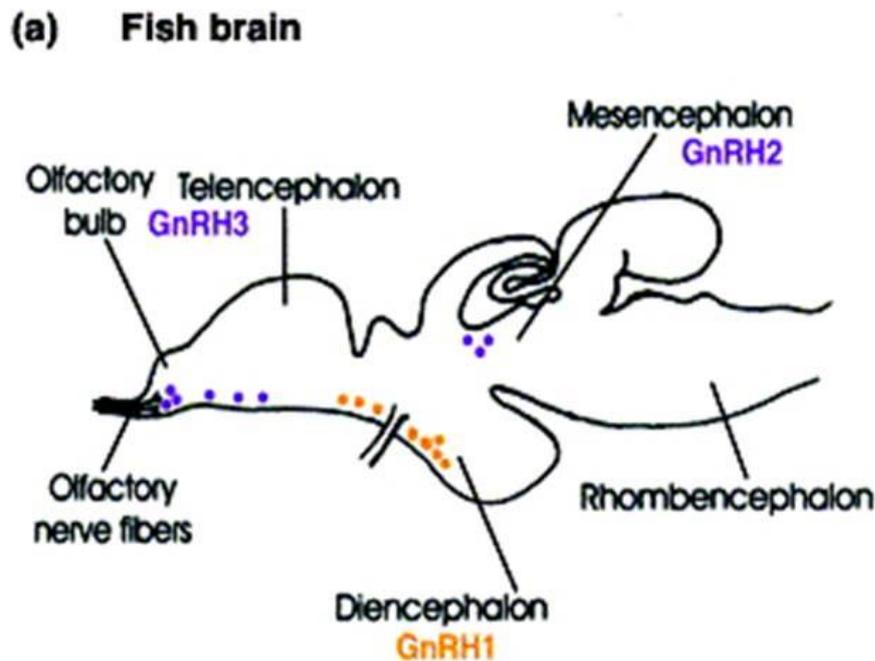


Figura 2: Representação esquemática da localização e formas de GnRH no encéfalo de peixes. Os locais das células produtoras de cada tipo de GnRH podem variar entre as espécies (Hanchate, 2011).

De acordo com diversos trabalhos, o GnRH2 é um potente estimulador de gonadotropinas *in vitro* (Bosma *et al.*, 2000; Lethimonier *et al.*, 2004; Kah *et al.*, 2007), muito provavelmente por ser um peptídeo conservado e estar presente na maioria das espécies (Millar, 2003).

Desde a sua descoberta nos teleósteos, pesquisas envolvendo este hormônio têm ganhado cada vez mais atenção, devido ao seu potencial uso na aquicultura (Mylonas *et al.*, 2010). O análogo de GnRH pode ser utilizado na aquicultura, pois os peixes reofílicos necessitam migrar para a cabeceira dos rios para reproduzir e quando em condições de cativeiro, não apresentam esse

comportamento devido ao confinamento. Para realizar então a reprodução artificialmente no cativeiro, são utilizados hormônios que atuam no eixo HHG, auxiliando no final da maturação dos gametas e desova. Nestes protocolos de indução à maturação final e desova, são utilizados GnRH análogos (entre outros hormônios) (Mylonas *et al.*, 2010). Adicionalmente, o GnRH pode ser utilizado na forma de injeções ou implantes, liberado de forma gradativa para promover a vitelogênese (Brambilla-Souza *et al.*, 2019).

Porém, não é somente o GnRH que regula as gonadotropinas, Tsutsui *et al.*, (2000), descreveram um novo peptídeo hipotalâmico que inibiu a liberação de gonadotropinas em *Coturnix japonica* (codornas japonesas). Esse peptídeo pertence à família LPXRF-amida (X=L ou Q) e foi caracterizado como parte integrante do eixo HHG em muitos vertebrados (Tsutsui *et al.*, 2015) e foi nomeado como hormônio inibidor de gonadotropina (GnIH). Outros estudos identificaram ortólogos GnIH em espécies de mamíferos e mostraram que o GnIH também poderia inibir a liberação de gonadotropinas nessas espécies (Kriegsfeld *et al.*, 2006; Ubuka *et al.*, 2012). Em peixes, ortólogos de GnIH exercem papel conflitante, pois apresentam ação estimulatória e inibitória na expressão, síntese e liberação das gonadotropinas em diferentes espécies (Ubuka *et al.*, 2018) (Figura 3). Em goldfish GnIH foi responsável pela redução dos níveis plasmáticos de Lh (Zhang *et al.*, 2010), enquanto no ciclídeo *Cichlasoma dimerus*, cdGnIH-2 estimulou a liberação de Fsh *in vitro* (Di Yorio *et al.*, 2016).

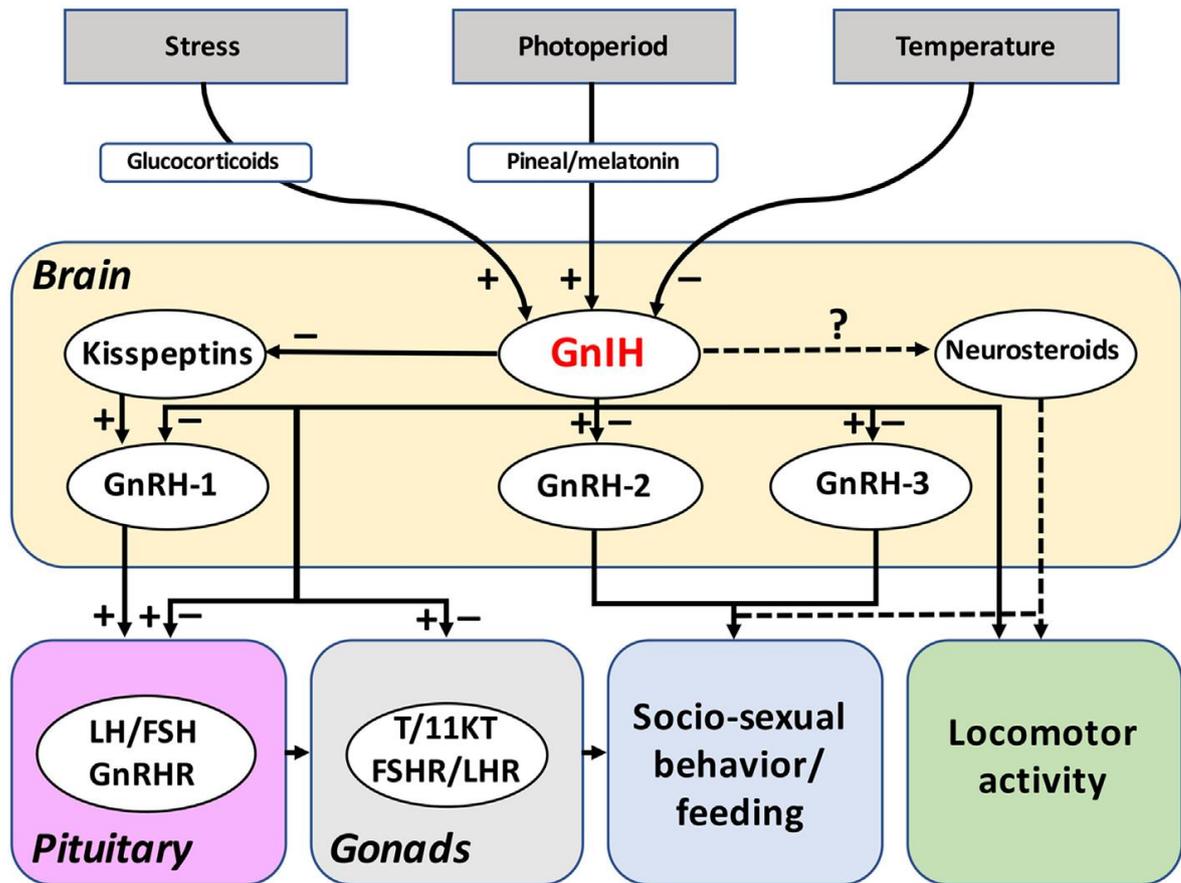


Figura 3: Modelo esquemático resumido das ações do GnIH na regulação do sistema GnIH em peixes. A maioria dos estudos se concentrou na ação do GnIH atuando na síntese e liberação de gonadotropinas, evidenciando efeitos inibitórios e estimuladores. Entretanto, alguns estudos abordaram os efeitos do GnIH nos sistemas neuroendócrinos e na fisiologia gonadal em peixes (Muñoz-Cueto *et al.*, 2017).

Em relação às gonadotropinas (Fsh e Lh), estas são glicoproteínas com cadeias de 30 a 50 KDa compostas de duas subunidades diferentes: a subunidade alfa, que é comum a ambas as gonadotropinas (Gpha), e também para tireotropina (Tsh), e a subunidade beta, que é variável, conferindo a atividade biológica e especificidade aos diferentes hormônios. Cada subunidade (Gpha, Fshb e Lhb) é codificada por um gene distinto (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Devido às similaridades funcionais com as gonadotropinas dos tetrápodes, as gonadotropinas de peixes, anteriormente denominadas de GTHI e GTHII, foram também chamadas de Fsh e Lh, respectivamente (Quérat *et al.*, 1994). As gonadotropinas (Fsh e Lh) de dezenas de espécies de peixes já foram purificadas

ou clonadas (Swanson *et al.*, 2003), inclusive aquelas da espécie do presente estudo (Jesus *et al.*, 2017).

A produção de gonadotropinas por duas populações celulares distintas ocorre na maioria das espécies de teleósteos, inclusive no lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae*, como demonstrado por Jesus *et al.*, (2017) (Figura 4). No entanto, os hormônios gonadotrópicos podem ser expressos e produzidos por uma única população de células gonadotrópicas, como em *Serrasalmus maculatus* (Nóbrega *et al.*, 2016), *Seriola dumerilii* (Garcia-Hernandez *et al.*, 2002) e *Xiphoporus maculatus* (Magliulo-Cepriano *et al.*, 1994).

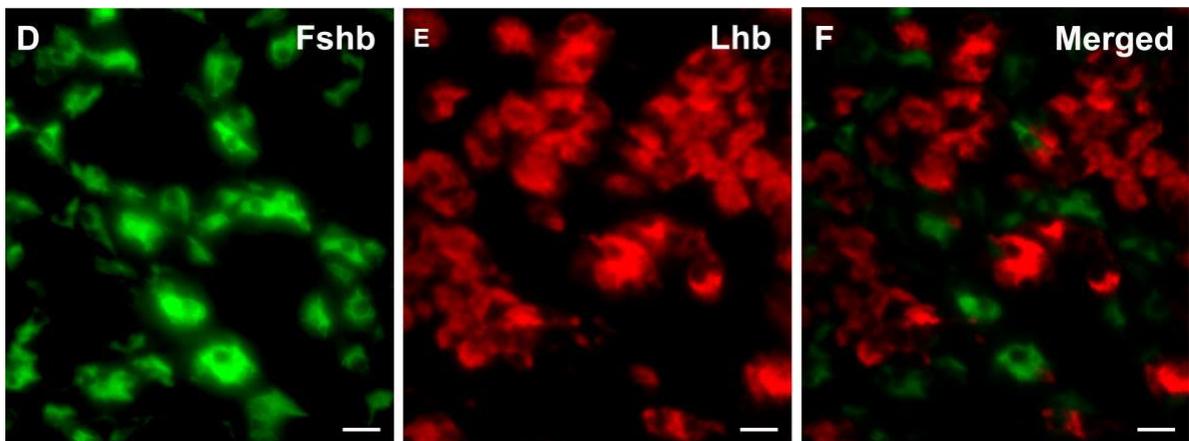


Figura 4: Fotomicrografia de fluorescência, modificada de Jesus *et al.*, (2017). Imunofluorescência dupla com o uso de anticorpos policlonais específicos anti- *A. altiparanae* Fshb (D) e anti- *A. altiparanae* Lhb (E) evidenciando que as marcações para Fshb ou Lhb estão presentes em células gonadotrópicas distintas (F), e que os sinais não se colocalizam.

O papel das gonadotropinas foi bastante estudado em salmonídeos (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Nestes, o Fsh está envolvido nas fases iniciais do ciclo reprodutivo (vitelogênese em fêmeas e espermatogênese em machos), enquanto o Lh atua nas etapas finais (maturação final dos oócitos e ovulação em fêmeas e espermiacão em machos) (Swanson *et al.*, 2003). Estudos imuno-histoquímicos em machos de *Serrasalmus maculatus* e *Pimelodus maculatus* sugerem a possível participação das duas gonadotropinas tanto na maturação dos espermatozoides, quanto na espermiacão (Nóbrega *et al.*, 2016). No entanto, apesar de diversos estudos, o papel das gonadotropinas e sua regulação endócrina, em particular sobre a função testicular, ainda não são descritas para a maioria das espécies neotropicais do Brasil. Portanto, estudos para desvendar a

regulação do eixo HHG são fundamentais para melhorar nosso entendimento sobre os mecanismos hormonais envolvidos no processo reprodutivo dessas espécies. Sabe-se por sua vez, que as gonadotropinas estão totalmente envolvidas na reprodução de vertebrados, sendo estimuladas principalmente pelo GnRH, mas também sofrem o controle do GnIH e dos esteróides sexuais, formando uma rede endócrina coordenando a reprodução.

Entendendo a regulação do eixo reprodutivo, é possível compreender quando mecanismos alteram o funcionamento do mesmo. Um exemplo desta alteração ocorre na presença de desreguladores endócrinos (DE), que são capazes de interferir nesse processo, sendo definidos como componentes que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios secretados naturalmente pelos organismos, e que regulam a homeostase, desenvolvimento, comportamento e reprodução (Nishi *et al.*, 2002).

Em condições normais, nos machos, o Fsh sintetizado pela adeno-hipófise, é liberado e transportado via corrente sanguínea até as células de Leydig nos testículos, estimulando a síntese da testosterona (T). A produção desse hormônio é resultado de uma cascata enzimática, iniciada pelo colesterol que produzirá testosterona que será convertido pela enzima 11 β -hidroxytestosterone (11 β HSD) em 11-KT (Fernandes *et al.*, 2011). O aumento nos níveis plasmáticos de 11-KT inibem a síntese de Fsh por meio de uma alça de *feedback* negativo e juntamente com o GnRH estimulam a secreção adeno-hipofisária de Lh. Desta forma, os esteroides sexuais atuam ativamente no processo reprodutivo, participando de todo o processo de gametogênese, assim como regulando os hormônios hipotalâmicos e hipofisários (Nagahama *et al.*, 1994).

Diante da complexidade do processo reprodutivo e do notório aumento da influência humana nos sistemas naturais e com isso, o aumento da concentração de DEs no ambiente aquático, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), diclofenaco e ibuprofeno, torna-se fundamental investigar os aspectos antrópicos que causam alterações na reprodução dos organismos aquáticos (Ribeiro *et al.*, 2012).

O ibuprofeno é o nome que deriva das iniciais do ácido isobutilpropanoicofenólico (isobutilfenilpropanóico), possui fórmula química

$C_{13}H_{18}O_2$, massa molar 206.28 g/mol e se apresenta como um pó cristalino branco ou cristais incolores, nomenclatura IUPAC Ácido (RS)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanoico, ácido 2-(4-isobutilfenil)propanoico, ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico e número CAS 15687-27-1.

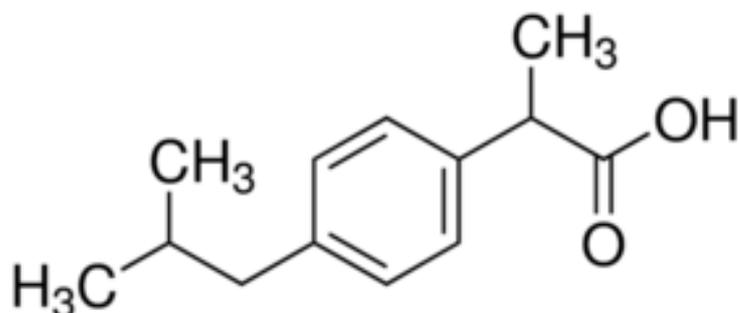


Figura 5. Estrutura bidimensional do ibuprofeno (Sigma-14883).

O diclofenaco é derivado do nome 2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]benzeneacetic acid sodium salt, possui fórmula química $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$, massa molar 318,13 g/mol, se apresenta como um pó sólido e branco, nomenclatura IUPAC 2-[2[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetic acid e CAS Number: 15307-79-6.

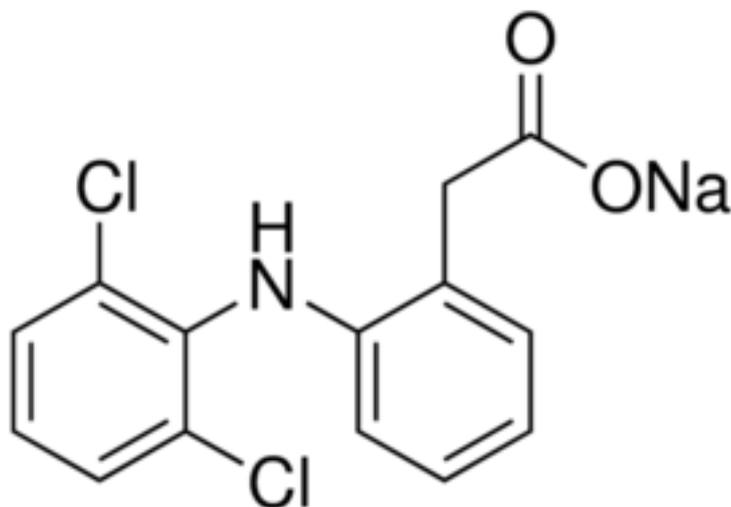


Figura 6. Estrutura bidimensional do diclofenaco (Sigma - D6899).

Em relação ao mecanismo de ação (MoA) dos AINEs, os DEs podem agir diretamente com efeito sobre os receptores hormonais, ou ainda, terem ação indireta, podendo interferir na síntese, conversão, liberação ou transporte de

hormônios e também podem atuar por mecanismos moleculares e epigenéticos, influenciando na expressão gênica (Heindel *et al.*, 2013).

Diversos estudos vêm sendo realizados avaliando o MoA, demonstrando que esses compostos podem modular a função endócrina de tecidos e células relacionados à reprodução, com trabalhos desde mamíferos, que demonstram a redução significativa nas taxas de ovulação e prejuízo na fertilidade de machos de camundongos após administração crônica de ibuprofeno (Martini *et al.*, 2008) e em peixes, o ibuprofeno afetou vários parâmetros relacionados à reprodução de medakas, como a indução de vitelogenina em peixes machos, diminuiu a desova e atrasou a eclosão dos ovos, mesmo quando eles foram transferidos e cultivados em água limpa (Han *et al.*, 2010). O diclofenaco apresenta resultados similares em peixes com, por exemplo, também o atraso da eclosão em medakas e um aumento do índice gonadossomático (Lee *et al.*, 2011).

A realização de estudos que visam compreender como são afetadas as vias de sinalização celular que acarretam na expressão dos hormônios e/ou enzimas envolvidas na síntese dos hormônios gonadotrópicos e esteroidais dos tecidos, vai auxiliar de forma significativa o entendimento do MoA dos AINEs nas espécies de peixes. Para conduzir os estudos deste projeto foi eleito como modelo a espécie *Astyanax altiparanae*, um teleósteo sul-americano nativo da bacia do Alto Paraná no Brasil, pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, e família Characidae (Garutti e Britski, 2000), sendo conhecido localmente como lambari-do-rabo-amarelo (Nakatani *et al.*, 2001). Algumas características da espécie *A. altiparanae*, como fácil reprodução, alta sobrevivência das larvas e alevinos e rápido crescimento, contribuíram para a grande importância comercial desta espécie (Porto-Foresti *et al.*, 2005).

Além disso, a espécie tem sido muito utilizada como modelo de estudo em diversas pesquisas, descrevendo o eixo reprodutivo da espécie, com estudos relacionados ao hipotálamo e GnRH (Gomes *et al.*, 2013), hipófise e gonadotropinas (Jesus *et al.*, 2017), testículos e espermatogônias tronco (Costa *et al.*, 2014, Camargo *et al.*, 2017), morfologia ovariana (Cassel *et al.*, 2017), reprodução em cativeiro (Chehade *et al.*, 2015 e Brambila-Souza *et al.*, 2019), desenvolvimento embrionário (Pereira-Santos *et al.*, 2016), desenvolvimento gonadal (Adolfi *et al.*, 2015), qualidade dos gametas (Yasui *et al.*, 2015), em

estudos de biotecnologia com a depleção da espermatogênese para protocolos de transplante de gametas (Siqueira-Silva *et al.*, 2015), além de avaliação dos efeitos de poluentes aquáticos (Kida *et al.*, 2016; Abdalla *et al.*, 2019; Pinheiro *et al.*, 2019; Godoi *et al.*, 2020).

Diante do que foi abordado, as hipóteses do trabalho são:

1. As gonadotropinas produzidas pela hipófise são moduladas diretamente pelos neuro-hormônios GnRH e GnIH, *in vitro*.
2. Os anti-inflamatórios (diclofenaco e ibuprofeno) agem como DE, sendo capazes de interferir na expressão gênica das gonadotropinas (*fshb* e *lhb*) e nos esteroides gonadais (17 β -estradiol, testosterona e 11 cetotestosterona).

OBJETIVO GERAL

Com base na fundamentação teórica apresentada, o objetivo geral desta tese foi analisar o processo de regulação das gonadotropinas hipofisárias em machos de lambari *Astyanax altiparanae*, assim como entender os efeitos de anti-inflamatórios na síntese destas gonadotropinas e na liberação dos esteroides gonadais nos testículos desta mesma espécie *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tanto, os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a expressão das gonadotropinas *fshb* e *lhb* de machos de *Astyanax altiparanae*, em resposta a estímulos hormonais (GnRH e GnIH) *in vitro*;
2. Avaliar a expressão das gonadotropinas *fshb* e *lhb* de machos de *Astyanax altiparanae*, em resposta aos anti-inflamatórios (diclofenaco e ibuprofeno), *in vitro*;

3. Avaliar a liberação dos esteroides gonadais (17 β -estradiol, testosterona e 11 cetotestosterona) por fragmentos de testículo de *Astyanax altiparanae*, em resposta aos anti-inflamatórios (diclofenaco e ibuprofeno), *in vitro*.

MANUSCRITO 1

Effects of GnRH and GnIH in the pituitary explants of *Astyanax altiparanae* males

Resultados apresentados nessa tese, fazem parte do artigo publicado na *General and Comparative Endocrinology*¹

Giovana Souza Branco^{a,b}, Aline Gomes Melo^b, Juliana M. B. Ricci^b, Melanie Digmayer^b, Lázaro W. O. de Jesus^c, Hamid Habibi^d, Rafael Henrique Nóbrega^b

^aAquaculture Center of São Paulo State University (CAUNESP), São Paulo State University (UNESP) - Jaboticabal Campus, Jaboticabal, Brazil.

^bReproductive and Molecular Biology Group, Department of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP) - Botucatu Campus, Botucatu, Brazil.

^cInstitute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas - A. C. Simões Campus, Maceió, Brazil.

^dDepartment of Biological Sciences, University of Calgary - Calgary, Canada.

Abstract

The pituitary gonadotropins, Fsh (follicle-stimulating hormone) and Lh (luteinizing hormone), regulate testicular development and functions in all vertebrates. At the pituitary, different signaling systems regulate the synthesis and secretion of the gonadotropins, such as the hypothalamic neuropeptides GnRH (gonadotropin releasing hormone) and GnIH (gonadotropin-inhibitory hormone). While GnRH exerts stimulatory roles, the actions of GnIH remain controversial for many teleost species. Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of chicken GnRH2 (cGnRH2) and zebrafish GnIH-3 (zGnIH-3) on the male gonadotropin using pituitary explants from a neotropical species with economical and ecological relevance, *Astyanax altiparanae*. Our results showed that in males, cGnRH2 increased *fshb* and *lhb* mRNA levels in the pituitary explants. Interestingly, zGnIH-3 has no effect on basal gonadotropin expression, however zGnIH-3 decreased the cGnRH2-induced *fshb* and *lhb* transcripts in male pituitary explants. In the male brain slices, zGnIH-3 showed stimulatory effects, increasing *gnrh2* mRNA levels. Overall, our results suggested that GnIH seems to have dual regulatory actions on gonadotropin and GnRH2 expression of *A. altiparanae* males. This study provided basic information on endocrine regulation of *A. altiparanae* reproduction, and the obtained results will expand our knowledge,

¹ *General and Comparative Endocrinology* 273 (2019) 209–217

improving the reproductive management of this economically importante freshwater species.

Key words: Gonadotropin-releasing hormone, Gonadotropin-inhibitory hormone, Follicle-stimulating hormone, Luteinizing hormone, Lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae*.

1. Introduction

The reproductive process in vertebrates is derived from the close interactive relationship between environment (photoperiod, temperature, salinity, nutritional status, stress, among others) and internal physiological clues. In fish, similar to mammals, the brain-pituitarygonadal (BPG) axis synchronously exerts overall control over the gonadal development and function (Nagahama, 1994; Schulz *et al.*, 2001). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secreted by preoptic hypothalamic neurons stimulates the synthesis and release of two gonadotropins, follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh) (Nagahama, 1994). GnRH, first isolated in pigs (Matsuo *et al.*, 1971) and sheeps (Burgus *et al.*, 1972), is a neuropeptide composed of ten amino acid residues with different isoforms. Originally, the diferente isoforms were named according to the species from which they were isolated. Nevertheless, due to the increasing number of forms described, a phylogenetic classification has been adopted to distinguish them based on their location and function. Thus, three forms have been established: GnRH1, GnRH2, and GnRH3, where the latter one is exclusive to almost all teleosts (White and Fernald, 1998).

For many years, it was believed that GnRH was the only neuropeptide involved on gonadotropin synthesis and release. In 2000, however, Tsutsui and collaborators discovered a novel hypothalamic peptide which inhibited the gonadotropin release in Japanese quail. This peptide belongs to the LPXRFamide (X=L or Q) family and it was named as gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) (Tsutsui *et al.*, 2000). Further studies have identified GnIH orthologs in mammalian species and showed that GnIH could also inhibit gonadotropin release in these

species (Kriegsfeld *et al.*, 2006; Ubuka *et al.*, 2012). In most of the vertebrates, the cDNA sequence that encodes the GnIH precursor polypeptide encompasses three peptides that have LPXRFamide or LPXRFamide-like sequences at the C termini (see review at Muñoz-Cueto *et al.*, 2017). In teleost fish, it has been suggested three or two LPXRFamide or LPXRFamide-like peptides (Muñoz-Cueto *et al.*, 2017). However, the mature GnIH in fish is known only for goldfish, and this mature peptide aligns to the human LPXRFamide-related peptide 3 (RFRP-3) (Sawada *et al.*, 2002b). With regards to GnIH physiological roles in fish, there are conflicting observations with respect to its actions on gonadotropin release and reproduction. For example, GnIH exerts stimulatory effects on gonadotropin release in sockeye salmon pituitary cells (Amano *et al.*, 2006), tilapia (Biran *et al.*, 2014) and goldfish (Moussavi *et al.*, 2012, 2013). On the other hand, GnIH inhibited Fsh and Lh release in species, such as goldfish (Moussavi *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010), neotropical cichlid (Di Yorio *et al.*, 2016), cinnamon clownfish (Choi *et al.*, 2016) and sea bass (Paullada-Salmerón *et al.*, 2016). According to Muñoz-Cueto and collaborators (2017), these conflicting observations can be partially attributed to the endogenous GnIH which were not used in most of the studies, in addition to the nature of GnIH effects, which seems to be dependent on the species, sex, physiological status, concentration, route and time elapsed after administration. Gonadotropins (Fsh and Lh) are glycoproteins with 30–50 KDa chains composed of two different subunits: the alpha (α) subunit, which is common to both gonadotropins, and the beta (β) subunit, which is hormone-specific, and determines its biological activity (Schulz *et al.*, 2001). Each subunit (Gpha, Fsh β and Lh β) is encoded by a distinct gene (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). The role of gonadotropins and their endocrine regulation are still unknown for most of the Neotropical species, in particular for males. Therefore, studies to investigate the role of gonadotropins and their regulation are fundamental to improve our understanding on the hormonal mechanisms involved in the reproductive process of these species.

Astyanax altiparanae is a South American teleost species which is native to the Upper Paraná basin in Brazil. It belongs to the class Actinopterygii, order Characiformes, family Characidae (Garutti and Britski, 2000), and it is known locally as the lambari-do-rabo-amarelo (Nakatani *et al.*, 2001). *A. altiparanae* is a

fish whose traits include easy reproduction, good survival rate for larvae and juveniles, and rapid growth (Porto-Foresti *et al.*, 2005). For these reasons, the species is of substantial commercial importance (Porto-Foresti *et al.*, 2005). It also serves as a common study model in many topics of research (Adolfi *et al.*, 2015; Camargo *et al.*, 2017; Cassel *et al.*, 2017; Chehade *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2013; Jesus *et al.*, 2017; Pereira- Santos *et al.*, 2016; Siqueira-Silva *et al.*, 2015; Yasui *et al.*, 2015). In this context, the aim of this study is to evaluate the effects of chicken GnRH2 (cGnRH2) and zebrafish GnIH-3 (zGnIH-3) on *A. altiparanae fshb* and *lhb*, expression using pituitary explants from males.

The cGnRH2 peptide was used in this study because it is the most conserved and ancient form of GnRH. Moreover, cGnRH2 seems to be more potent in inducing gonadotropin release in many species of teleosts (Chang *et al.*, 1990; Goos *et al.*, 1997; Habibi *et al.*, 1992; Zohar *et al.*, 1995), including *A. altiparanae* (Chehade *et al.*, submitted). zGnIH-3 (or LPXRFa-3) was chosen because LPXRFa-3 is the mature peptide by mass spectrometry in goldfish brain (Sawada *et al.*, 2002a), and in vivo experiments demonstrated that zGnIH-3 was able to reduce the serum Lh levels in goldfish (Zhang *et al.*, 2010).

2. Material and methods

2.1. Animals

The specimens used in this study were obtained from commercial stocks and kept at the animal facility of the Reproductive and Molecular Biology Group, in the Department of Morphology, Institute of Biosciences of São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo. The animals were acclimated in round 250 L tanks for 40 days before the experiments. For the species identification, genomic DNA extracted from fins was used for COI gene sequencing and DNA amplification protocols. The sequences obtained were analyzed in the Geneious software and compared against the NCBI database. This step was performed in the Fish Genetics and Biology Group, in the Department of Morphology, Institute

of Biosciences of UNESP Botucatu. Animal housing and experimentations were consistent with Brazilian national regulations and were approved by São Paulo State University (IBB-UNESP) animal use and care committee (1030-CEUA-IBB/UNESP).

2.2. Histology

The animals were anesthetized with 0.1% benzocaine solution and their gonads were collected and fixed overnight in Karnovsky (4% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in a Sorensen phosphate buffer, 0.1M at pH 7.2). The testes and pituitary were embedded in historesin (Leica), sectioned with 3 μ m thickness using a Leica Surgipath DB80 LS microtome blade, stained with hematoxylin and eosin and analysed using an image capture system attached to a Leica DMA 4000B photomicroscope. The reproductive phase of each animal was assessed by histological analysis of their gonads in all experiments and pituitary glands in culture medium for 72 hours were also processed for histology.

2.3. Pituitary explant standardization

The *in vitro* assessment of gonadotropin expression was performed using a pituitary explant system adapted from Cánepa *et al.* (2008). The animals (males: n=24) were anesthetized in 0.1% benzocaine solution, and their pituitary glands were dissected out and washed rapidly in a saline solution. Each pituitary gland was cultivated in a 96-well plate containing 200 μ L per well of Leibovitz's L-15 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 0,01M HEPES (Merck, Darmstadt, Germany), 0.5% w/v bovine serum albumin fraction V (Roche, Mannheim, Germany), 0.25 μ g/mL amphotericine B (Fungizone; Invitrogen), 200 U/ml penicillin (Invitrogen), and 200 ug/ ml streptomycin (Invitrogen); pH was adjusted to 7.4. To evaluate whether the culture conditions could affect the basal gonadotropin expression and pituitary morphology, the pituitary glands were kept in the culture up to 72 h at 26 °C; medium was replaced every 24 h. The pituitaries were collected at time zero (immediately before the pituitary glands were placed in the culture medium), and after 24, 48, and 72 h of cultivation. After each period,

the pituitary glands (n=3 per period) were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until total RNA extraction. Some pituitaries were also collected for histological analysis.

2.4. Medium-term effects of cGnRH2 and zGnIH-3 on gonadotropin expression

To study the medium-term *in vitro* effects of cGnRH2 and zGnIH-3 on gonadotropin expression, five males in the same reproductive phase were used per treatment. The males were anesthetized in 0.1% benzocaine solution, and their brains and pituitary glands were dissected out and washed rapidly in a saline solution. Each pituitary gland was cultivated in Leibovitz's L-15 supplemented either in the absence or presence of hormonal treatment. The chicken GnRH (cGnRH2) was obtained from Bachem (H-4288) and zebrafish GnIH-3 (zGnIH-3 SGTGPSATLPQRFa or zf LPXRFa-3) was synthesized at the peptide services center of the University of Calgary (Calgary, AB, Canada). The treatments for the pituitaries were as follows: (1) negative control with only the L-15 medium; (2) cGnRH2 (10, 100, 1000 nM); and (3) zGnIH-3 (10, 100, 1000 nM); (4) co-treatment with cGnRH2 (100 nM) and zGnIH-3 (100 nM). In the co-treatment, the chosen concentration for cGnRH2 was based on its stimulatory effects on gonadotropin expression (see Results), while the one for zGnIH-3 was based on Moussavi *et al.* (2012).

Each pituitary gland was cultivated for 12 h at 26 °C. After this period, it was collected for gene expression analysis, as described below. The period of incubation for the pituitary explants (12 h) was based in our previous experiments (see 2.3 Pituitary Explant Standardization), which showed no changes on gonadotropin expression up to 48 h of incubation when compared to the time zero. Moreover, previous studies with goldfish primary pituitary cell culture used 12 h of incubation and showed stimulatory/inhibitory actions of GnIH peptide (Moussavi *et al.*, 2012). Therefore, we decided to use a medium-term exposure (12 h) to evaluate the acute effects (< 24 h) of cGnRH2 and zGnIH-3 in pituitaries from *A. altiparanae* males.

2.5. RNA extraction and RT-qPCR

The total RNA of each pituitary gland was extracted using the PureLink® RNA Mini Kit (Code 12183018A). The concentration (ng/μl) was evaluated using a NanoDrop One spectrophotometer (ThermoFisher). The samples obtained were treated with DNase in order to eliminate genomic DNA using Invitrogen DNase I Amplification Grade following standard procedures. After verifying RNA integrity, cDNA was synthesized using random hexamers and Superscript II Reverse Transcriptase Kit (ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions. To evaluate gonadotropin, real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed. Forward and reverse primers were designed according to specific sequences of *A. altiparanae fshb*, *lhb*, *elfa1* (Jesus *et al.*, 2017). Specificity and validation for *fshb*, *lhb* and *elfa1* primers are provided by Jesus *et al.* (2017). The 10 μL reactions were performed using SYBR Green (Applied Biosystem), 1.125 nM for each of the primers (forward and reverse) and 100 ng of total cDNA. The elongation factor 1 alpha (*ef1a*) was used as endogenous reference gene. The Cts were determined using a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The reactions underwent to 10 min at 95 °C (Holding stage), 15 s at 95 °C followed by 1 min at 60 °C (40 denaturation cycles – Cycling stage), followed by a melting curve from 60 °C to 95 °C. The relative mRNA levels of the target genes were determined using the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method, in which the expression of the studied genes was normalized using *ef1a* as the reference gene and subsequently calibrated to the expression values of the negative control

group.

2.6. Statistical analyses

The results were expressed as mean ± standard error (SE). The differences between two groups were identified using Student's unpaired t-test ($p < 0.05$). Comparisons between the means (more than two groups) were performed using one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls method ($p < 0.05$). The GraphPad Prism software, version 4.0 was used for all of the statistical analyses.

3. Results

3.1. Pituitary explant standardization

First we evaluated whether the culture conditions could affect the basal *fshb* and *lhb* expression over the period of incubation. We compared the *fshb* and *lhb* mRNA levels males immediately before the pituitary glands were placed in the culture médium, in this analysis, *lhb* was more expressed than *fshb* (Fig. 1).

The temporal analysis of *fshb* and *lhb* under basal culture conditions revealed that mRNA levels for both gonadotropins remained constant over the period with tendency toward decrease after 72 hculture (Fig. 2A, B).

Histological analysis of pituitary gland under culture conditions confirmed that, even after 72 h in the culture medium, the tissue maintained its standard structural characteristics; the adenohypophysis and neurohypophysis were preserved (Fig. 3A). For the pituitary explant standardization experiments, all animals were at the same stage of the reproductive cycle (terminology adopted according to Brown-Peterson *et al.*, 2011). The males were at the developing phase of the reproductive cycle, which is characterized by the presence of a continuous germinal epithelium (GE) and cysts at several stages of spermatogenesis (Fig. 3B).

3.2. *In vitro* effects of cGnRH2 and zGnIH-3 on *fshb* and *lhb* expression

Once we have determined the culture conditions, we used the same period of incubation (12 h) for all hormonal treatments. All males used were at the spawning capable phase (mid-GE subphase) of the reproductive cycle. In this phase, males have already undergone gonadal development and are physiologically prepared to reproduce. Histological analysis of testes showed all stages of spermatogenesis, GE continuous or discontinuous, and a large amount of spermatozoa in the testicular lumen (Fig. 3C).

Pituitary glands were incubated with cGnRH2 or/and zGnIH-3 for 12 h to evaluate the medium-term effects of these hypothalamic neuropeptides on

gonadotropin expression. Our results showed that pituitaries treated with 10 nM cGnRH2 did not exhibit changes in *fshb* (Fig. 4A) or *lhb* (Fig. 4B) gene expression compared to the control. On the other hand, higher doses of cGnRH2 (100 nM and 1000 nM) significantly stimulated both *fshb* (Fig. 4A) and *lhb* (Fig. 4B) mRNAs in relation to the control group. Interestingly, pituitary glands treated with doses of 10, 100 and 1000 nM zGnIH-3 did not show any changes on basal *fshb* (Fig. 5A) or *lhb* (Fig. 5B) mRNA levels.

However, in the pituitaries co-treated with cGnRH2 and zGnIH-3, the cGnRH2-induced gonadotropin expression was decreased in the presence of zGnIH-3 for both *fshb* (Fig. 6A) and *lhb* (Fig. 6B) mRNAs.

4. Discussion

This study aimed to evaluate the *in vitro* effects of cGnRH2 and zGnIH-3 on male *A. altiparanae* gonadotropin expression using pituitary explants. The first step we performed was to determine whether the gonadotropin expression could be affected under basal culture conditions in order to evaluate the viability of the pituitary explant technique for this species. The integrity of the pituitary gland tissue was also evaluated after the period of incubation system and also to determine the period of incubation for the hormonal treatments used in this study.

Immediately before the pituitary glands were placed in the culture medium, we showed that *lhb* levels were much higher than *fshb*. The varying patterns of gonadotropin expression, synthesis, and secretion are derived from interspecific differences, physiological condition and reproductive stage (Mateos *et al.*, 2002). In this context, studies on juveniles of *Morone saxatilis* have shown that *lhb* expression was higher than *fshb* (Hassin *et al.*, 1995). In pre-gametogenic salmonids, however, *fshb* expression has been found to be much higher than that of *lhb* (Gomez *et al.*, 1999; Weil *et al.*, 1995).

This result suggests that *lhb* is more dependent of hypothalamic and/or gonadal inputs than *fshb*. It has been shown that gonadotropic cell stimulation depends not only on GnRH stimulation via the hypothalamus, but also on stimuli

produced by the gonads by means of positive or negative feedback loops (Yaron and Levavi-Sivan, 2011). With respect to the latter one, Mateos *et al.* (2002) found that estradiol (E2), testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) contribute to an increase in *lhb* expression in the pituitary, indicating positive feedback exerted on *lhb* mRNA levels during the resting phase of *Dicentrarchus labrax* gonads. E2 and T stimulatory effects on *lhb* mRNA levels have been also described in *Oncorhynchus tshawytscha* (Trinh *et al.*, 1986; Xiong *et al.*, 1994), *Oncorhynchus kisutch* (Dickey and Swanson, 1998), *Carassius auratus* (Huggard *et al.*, 1996), and *Anguilla anguilla* L. pituitary cell cultures (Huang *et al.*, 1997).

Future studies involving the administration of different concentrations of steroid hormones and subsequent analysis of the gonadotropin expression will likely aid in the understanding of the effects of androgens and estrogens on *A. altiparanae* pituitaries.

Temporal gene expression analysis of male pituitary explants showed that relative mRNA levels of *fshb* and *lhb* remained stable over the period with tendency of decrease after 72 h of culture. In addition, the morphological analyses indicated that the *in vitro* conditions did not change the structure or integrity of the pituitary gland. Moreover, previous studies with goldfish primary pituitary cell culture used 12 h of incubation and showed stimulatory/inhibitory actions of GnIH peptide (Moussavi *et al.*, 2012, 2013). Based on that, we decided to use a medium-term exposure (12 h) to evaluate the acute effects of cGnRH2 and zGnIH-3 in *A. altiparanae* pituitaries.

It has been shown in many teleosts that GnRH regulates gonadotropin expression according to developmental and reproductive stages (Martyniuk *et al.*, 2009). In the current study, when cultivated at higher concentrations (100 nM and 1000 nM), cGnRH2 significantly increased the expression of *A. altiparanae fshb* and *lhb* after 12 h of culture. Similar results were observed in primary culture of pituitary cells from salmon *Oncorhynchus kisutch*, where GnRH increased *fshb* and *lhb* mRNA levels (Dickey and Swanson, 2000). This effect was also seen for protein levels using organotypic cultures prepared from hypothalamic-pituitary slices of tilapia; GnRH induced increases in Lh and Fsh secretion (Levavi- Sivan *et*

al., 2005). On the other hand, GnRH3 reduced *lhb* mRNA levels in coho salmon pituitary cells *in vitro* (Luckenbach *et al.*, 2010).

Kumakura *et al.* (2003, 2004) showed that GnRH has no effect on the *fshb* subunit mRNA levels in *Pagrus major*. Our results indicate that lower doses of cGnRH2 (such as 10 nM) are insufficient to stimulate expression of *fshb* and *lhb* in *A. altiparanae* male pituitaries, but that, at higher concentrations, cGnRH2 most likely stimulates the production of gonadotropins. Future experiments to quantify the amount of Fsh and Lh released in the culture media by the pituitary explants are likely to provide more information on this topic.

The gonadotropin-inhibitory hormone, GnIH, is known by its inhibitory roles on the reproductive processes of birds and mammals (Kriegsfeld *et al.*, 2006; Tsutsui *et al.*, 2000; Ubuka *et al.*, 2006, 2012). GnIH acts on GnRH neurons modulating the GnRH-induced gonadotropin release (Smith *et al.*, 2012; Ubuka *et al.*, 2012). Nevertheless, the effects of GnIH orthologs in fish seems to be conflicting, because GnIH can either exert stimulatory or inhibitory roles on gonadotropin expression and release (Muñoz-Cueto *et al.*, 2017; Ubuka and Parhar, 2018). In our study, zGnIH-3 (LPXRFa-3 or GnIH-3) showed no effects on the basal expression of male *A. altiparanae* *fshb* or *lhb* mRNA levels.

However, the same peptide reduced the plasma levels of Lh in goldfish (Zhang *et al.*, 2010). Interestingly, when evaluating the co-treatment of cGnRH2 with zGnIH-3, we showed that zGnIH-3 decreased the cGnRH2-induced expression of *A. altiparanae* *fshb* and *lhb*. Similar results were found in goldfish primary pituitary cell culture; where goldfish GnIH-2 (gGnIH-2) suppressed the LHRH (Luteinizing hormonereleasing hormone)-induced gonadotropin expression (Qi *et al.*, 2013). In accordance with these results, Moussavi *et al* (2013) showed that coadministration with gGnIH-3 attenuated the stimulatory effects of salmon GnRH on *fshb* and *lhb* mRNA levels in mid and late gonadal recrudescence of goldfish. Taken together, the results presented in this study indicate that zGnIH-3 does not modulate basal *fshb* and *lhb* expression levels, but it attenuated the cGnRH2 stimulatory effects on gonadotropin expression of *A. altiparanae* males (Fig. 7).

Therefore, we conclude that zGnIH-3 exerts a regulatory role over the *A. altiparanae* male reproductive axis by modulating the gonadotropic cell. This study provided basic information on endocrine regulation of *A. altiparanae* males with respect to GnRH and GnIH. The obtained results will expand our knowledge on *A. altiparanae* reproduction and improve the reproductive management of this economically important freshwater species. Moreover, these results will help to clarify the role of GnIH in regulating *A. altiparanae* reproduction.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil) (14/07620-7; 15/12104-0; 13/ 20450-0); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) (granted to GSB) and Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, Canada) (granted to HRH). The authors would like to thank the Aquaculture Center of São Paulo State University (CAUNESP) and Institute of Biosciences of Botucatu (IBB – UNESP). The authors are also grateful to Rodrigo Augusto Paixão Brasileiro for technical assistance in the scheme drawing and Ms. Fabilene Gomes Paim and Dr. Claudio Oliveira for COI gene sequencing.

References

- ADOLFI, M.C., CARREIRA, A.C.O., JESUS, L.W.O., BOGERD, J., FUNES, R.M., SCHARTL, M., SOGAYAR, M.C., BORELLA, M.I., 2015. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13, 2.
- AMANO, M., MORIYAMA, S., IIGO, M., KITAMURA, S., AMIYA, N., YAMAMORI, K., UKENA, K., TSUTSUI, K. 2006. Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon. *Journal of Endocrinology.* 188, 417-423.
- BIRAN, J., GOLAN, M., MIZRAHI, N., OGAWA, S., PARHAR, I.S., LEVAVI-SIVAN, B., 2014. LPXRFa, the piscine ortholog of GnIH, and LPXRF receptor positively regulate gonadotropin secretion in *Tilapia (Oreochromis niloticus)*. *Endocrinology* 155, 4391–4401.
- BROWN-PETERSON, N.J., WYANSKI, D.M., SABORIDO-REY, F., MACEWICZ, B.J., LOWERRE-BARBIERI, S.K., 2011. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Mar. Coastal Fish. Dynam. Manag. Ecosyst. Sci.* 3, 52–70.
- BURGUS, R., BUTCHER, M., AMOSS, M., LING, N., MONAHAN, M., RIVIER, J., FELLOSO, R., BLACKWELL, R., VALE, W., GUILLEMIN, R. 1972. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF). *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 69, 278–282.
- CAMARGO, M.P., CASSEL, M., JESUS, L.W.O., NÓBREGA, R.H., BORELLA, M.I. Characterization of undifferentiated spermatogonia and the spermatogonial niche in the lambari fish *Astyanax altiparanae*. *Theriogenology.* 96, 97-102.
- CASSEL, M., CHEHADE, C., BRANCO, G.S., CANEPPELE, D., ROMAGOSA, E., BORELLA, M.I. 2017. Ovarian development and reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over a year and its application in fish farming. *Theriogenology.* 98, 1-15.
- CHANG, J.P., WONG, A.O., VAN-DER-KRAAK, G., VAN-GOOR, F. 1992. Relationship between cyclic AMP-stimulated and native gonadotropin-releasing

hormone-stimulated gonadotropin release in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology*. 86, 359-377.

CHEHADE, C., CASSEL, M., BORELLA, M.I., 2015. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. *Neotropical Ichthyology* 13, 205–212.

CHEHADE, C., AMARAL, F.G., BRANCO, G.S., CASSEL, M., JESUS, L.W.O., COSTA, F.G., BORDIN, S.A., MOREIRA, R.G., BORELLA, M.I. Molecular Characterization of Different PreproGnRHs in *Astyanax altiparanae* (Characiformes): Effects of GnRH on female reproduction. Submitted in *Molecular Reproduction and Development*.

CHOI, Y.J., KIM, N.N., HABIBI, H.R., CHOI, C.Y., 2016. Effects of gonadotropin inhibitory hormone or gonadotropin-releasing hormone on reproduction-related genes in the protandrous cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 235, 89–99.

COSTA, F.G., ADOLFIB, M.C., GOMES, C.C., JESUS, L.W.O., BATLOUNI, S.R., BORELLA, M.I. 2014. Testes of *Astyanax altiparanae*: The Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis. *Micron*. 61, 20-27.

DICKEY, J.T., SWANSON, P. 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kitsutch*). *J. Mol. Endocrinol.* 21, 291–306.

DICKEY, J.T., SWANSON, P. 2000. Effects of Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone on Follicle Stimulating Hormone Secretion and Subunit Gene Expression in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology*. 118, 436–449.

DI YORIO, M.P., PÉREZ SIRKIN, D.I., DELGADIN, T.H., SHIMIZU, A., TSUTSUI, K., SOMOZA, G.M., VISSO, P.G. 2016. Gonadotropin-inhibitory hormone in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: structure, brain distribution and differential effects on the secretion of gonadotropins and growth hormone. *J. Neuroendocrinol.*, v. 28, 5.

GARUTTI, V., BRITSKI, H.A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) da bacia do alto Rio Paraná e considerações sobre

as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações Museu de Ciências e Tecnologia PUC Série Zoologia. 13, 65-88.

GOMES, C.C., COSTA, F. G., BORELLA, M. I. 2013. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). Micron. 52-53, 33-38.

GOMEZ, J.M., WEIL, C., OLLITRAULT, M., LE BAIL, P.Y., BRETON, B., LE GAC, F. 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropina subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and Comparative Endocrinology. 113, 413–428.

GOOS, H.J.T.H., BOSMA, P.T., BOGERD, J., TENSEN, C.P., LI, K.W., ZANDBERGEN, M.A., SCHULZ, R.W., 1997. Gonadotropin-releasing hormones in the African catfish: molecular forms, localization, potency and receptors. Fish Physiol. Biochem. 17 (1–6), 45–51.

HABIBI, H.R., PETER, R.E., NAHORNIAK, C.S., MILTON, R.C.L., MILLAR, R.P., 1992. Activity of vertebrate gonadotropin-releasing hormones and analogs with variant amino acid residues in positions 5, 7 and 8 in the goldfish pituitary. Regul. Pept. 37, 271–284.

HASSIN, S., ELIZUR, A., ZOHAR, Y. 1995. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotrophin-I and -II subunits. J. Mol. Endocrinol. 15, 23–35.

HUANG, Y.S., SCHMITZ, M., LE BELLE, N., CHANG, C.F., QUERAT, B., DUFOUR, S. 1997. Androgens stimulate gonadotropin-II b subunit in eel pituitary cells *in vitro*. Mol. Cell. Endocrinol. 131, 157–166.

HUGGARD, D., KHAKOO, Z., KASSAM, G., MAHMOUD, S.S., HABIBI, H.R. 1996. Effect of testosterone on maturational gonadotropina subunit messenger ribonucleic acid levels in the goldfish pituitary. Biol. Reprod. 54, 1184–1191.

JESUS, L.W.O., BOGERD, J., VIECELI, F.M., BRANCO, G.S., CAMARGO, M.P., CASSEL, M., MOREIRA, R.G., YAN, C.Y.I., BORELLA, M.I. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: Molecular characterization,

spatiotemporal expression and their possible role on female reproductive dysfunction in captivity. *General and Comparative Endocrinology*. 246, 150-163.

KRIEGSFELD, L.J., MEI, D.F., BENTLEY, G.E., UBUKA, T., MASON, A.O., INOUE, K., UKENA, K., TSUTSUI, K., SILVER, R. 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103, 2410-2415.

KUMAKURA, N., OKUZAWA, K., GEN, K., KAGAWA, H. 2003. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*). *General and Comparative Endocrinology*. 131, 264-273.

KUMAKURA, N., OKUZAWA, K., GEN, K., YAMAGUCHI, S., LIM, B.S., KAGAWA, H. 2004. Effects of gonadotropin-releasing hormone on pituitary-ovarian axis of one-year old pre-pubertal red seabream. *General and Comparative Endocrinology*. 138, 105-112.

LEVAVI-SIVAN, B., BOGERD, J., MAÑANÓS, E.L., GÓMEZ, A., LAREYRE, J.J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*. 65, 34–89.

LUCKENBACH, J.A., DICKEY, J.T., SWANSON, P. 2010. Regulation of pituitary GnRH receptor and gonadotropin subunits by IGF1 and GnRH in prepubertal male coho salmon. *General and Comparative Endocrinology*. 167, 387-396.

MARTYNIUK, C.J., KROLL, K.J., PORAK, W.F., STEWARD, C., GRIER, H.J., DENSLOW, N.D., 2009. Relationship between gonadotropin, growth hormone, and estrogen receptor mRNA expression in the pituitary gland of largemouth bass. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 306–317.

MATEOS, J., MANANOS, E., CARRILLO, M., ZANUY S. 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 132, 75–86.

MATSUO, H, BABA, Y, NAIR, R.M, ARIMURA, A, SCHALLY, A.V. 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochemistry Biophysical Research Communication*. 43, 1334–1339.

MOUSSAVI, M., WLASICHUK, M., CHANG, J.P., HABIBI, H.R. 2012. Seasonal effect of GnIH on gonadotrope functions in the pituitary of goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 350. 53–60.

MOUSSAVI, M., WLASICHUK, M., CHANG, J.P., HABIBI, H.R., 2013. Seasonal effect of gonadotrophin inhibitory hormone on gonadotrophin-releasing hormone-induced gonadotroph functions in the goldfish pituitary. *J. Neuroendocrinol*. 25, 506–516.

MUÑOZ-CUETO, J.A., PAULLADA-SALMERÓN, J.A., ALIAGA-GUERRERO, M., COWAN, M.E., PARHAR, I.S., UBUKA, T. A Journey through the Gonadotropin-inhibitory Hormone System of Fish. 8:285. doi: 10.3389/fendo.2017.00285

NAGAHAMA, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*. 38, 217-229.

NAKATANI, K., AGOSTINHO, A.A., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, P.V., MAKRAKIS, M.C., PAVANELLI, C.S. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM. 378 p.

PAULLADA-SALMERÓN, J.A., COWAN, M., ALIAGA-GUERRERO, M., MORANO, F., ZANUY, S., MUÑOS-CUETO, J. 2016. Gonadotropin Inhibitory Hormone Down-Regulates the Brain-Pituitary Reproductive Axis of Male European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*. 94(6), 121, 1–11.

PEREIRA DOS SANTOS, M., YASUI, G.S., XAVIER, P.L.P., ADAMOV, N.S.M., NASCIMENTO, N.F., FUJIMOTO, T., SENHORINI, J., NAKAGHI, L.S.O. 2016. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). *Zygote*. 24, 795-807.

PORTO-FORESTI, F., CASTILHO-ALMEIDA, R.B., FORESTI, F. 2005. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTO,

B., GOMES, L. C. (Ed.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM, p. 470.

QI, X., ZHOU, W., LI, S., LU, D., Yi, S., XIE, R., LIU, X., ZHANG, Y., LIN, H. 2013. Evidences for the regulation of GnRH and GTH expression by GnIH in the goldfish, *Carassius auratus*. Mol Cell Endocrinol. 366, 9–20.

SAWADA, K., UKENA, K., KIKUYAMA, S., TSUTSUI, K. 2002a. Identification of a cDNA encoding a novel amphibian growth hormone-releasing peptide and localization of its transcript. Journal of Endocrinology. 174, 395-402.

SAWADA, K., UKENA, K., SATAKE, H., IWAKOSHI, E., MINAKATA, H., TSUTSUI, K. 2002b. Novel fish hypothalamic neuropeptide - Cloning of a cDNA encoding the precursor polypeptide and identification and localization of the mature peptide. European Journal of Biochemistry. 269, 6000-6008.

SCHULZ, R.W., VISCHER, H.F., CAVACO, J.E., SANTOS, E.M., TYLER, C.R., GOOS, H.J., BOGERD, J. 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Biochemistry and Molecular Biology. 129, 407–17.

SIQUEIRA-SILVA, D.H., SILVA, A.P.S., NINHAUS-SILVEIRA, A., VERISSIMO-SILVEIRA, R. 2015. Morphology of the urogenital papilla and its component ducts in *Astyanax altiparanae*, Garutti & Britski, 2000 (Characiformes: Characidae). Neotrop. Ichthyol. 13, 309–316.

SMITH, J.T., ROSS YOUNG, I., VELDHUIS, J.D., CLARKE, I.J. 2012. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) secretion into the ovine hypophyseal portal system. Endocrinology. 153, 3368–3375.

TRINH, K.Y., WANG, N.C., HEW, C., CRIM, L.W. 1986. Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin b subunit. Eur. J. Biochem. 159, 619–624.

TSUTSUI, K., SAIGOH, E., UKENA, K., TERANISHI, H., FUJISAWA, Y., KIKUCHI, M., ISHII, S., SHARP, J.P. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. Biochemical and Biophysical Research Communications. 275, 661-667.

UBUKA, T., PARHAR, I. 2018. Dual Actions of Mammalian and Piscine Gonadotropin-Inhibitory Hormones, RFamide-Related Peptides and LPXRFamide

Peptides, in the Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis. *Front. Endocrinol.* <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00377>

UBUKA, T., UKENA, K., SHARP, P.J., BENTLEY, G.E., TSUTSUI, K. 2006. Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology*. 147, 1187-1194.

UBUKA, T., INOUE, K., FUKUDA, Y., MIZUNO, T., UKENA, K., KRIEGSFELD, J., TSUTSUI, K. 2012. Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology*. 153, 373–385.

WEIL, C., BOUGOUSSA-HOUADEC, M., GALLAIS, C., ITOH, S., SEKINE, S., VALOTAIRE, Y. 1995. Preliminary evidence suggesting variations of GtH 1 and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*. 100, 327–333.

WHITE, R.B., FERNALD, R.D. 1998. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species. *General and Comparative Endocrinology*. 112(1), 17-25.

XIONG, F., LIU, D., LE DREAN, Y., ELSHOLTZ, H.P., HEW, C.L. 1994. Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary gonadotropin IIb subunit gene during salmon maturation. *Mol. Endocrinol.* 8, 782–793.

ZHANG, Y., LI, S., LIU, Y., LU, D., CHEN, H., HUANG, X., LIU, X., MENG, Z., LIN, H., CHENG, C.H.K. 2010. Structural diversity of the gnih/gnih receptor system in teleost: Its involvement in early development and the negative control of LH release. *Peptides*. 31, 1034-1043.

ZOHAR, Y., ELIZUR, A., SHERWOOD, N.M., POWELL, J.F.F., RIVIER, J.E., ZMORA, N., 1995. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97, 289–299.

YARON, Z., LEVAVI-SIVAN, B., 2011. Endocrine regulation of fish reproduction. In: Farrell, A.P. (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. Academic Press, San Diego, pp. 1500–1508.

YASUI, G.S., SENHORINI, J.A., SHIMODA, E., PEREIRA-SANTOS, M., NAKAGHI, L.S.O., FUJIMOTO, T., ARIAS-RODRIGUEZ, L., SILVA, L. A. 2015. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*. 9:3, 464–470.

Figure Legends

Figure 1. Relative expression of *A. altiparanae fshb* and *lhb* mRNAs in the pituitary of males at the same reproductive phase (spawning capable). mRNA levels of *fshb* and *lhb* were normalized with mRNA levels of *ef1a* from the pituitary of *A. altiparanae* and were analyzed using RT-qPCR. different letters denote significant differences between the groups ($p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm standard error (SE).

Figure 2. The relative expression of *fshb* and *lhb* mRNAs in the pituitary gland of *A. altiparanae* males. *fshb* and *lhb* mRNA levels were normalized with the mRNA levels of *ef1a* and expressed as values relative to expression at time zero. Bars indicate mean \pm standard error (SE); different letters denote significant differences between the groups ($p < 0.05$).

Figure 3. (A) Histological section of the pituitary gland of the lambari after 72 hours in an L-15 culture medium (*: neurohypophysis). **(B)** Histological sections of lambari testes at the developing phase (Sg: spermatogonia, Sc: spermatocytes; Sz: spermatozoa; CGE: continuous germinal epithelium). Animal used in the standardization experiment. **(C)** Histological section of lambari testes in the mid-germinal epithelium subphase of the spawning capable phase. Presence of continuous germinal epithelium (CGE) and discontinuous germinal epithelium (DGE); Sz: spermatozoa. Animal used in the GnRH/GnIH experiment. Bars: A e B: 50 μ m, C: 25 μ m.

Figure 4. Relative *fshb* and *lhb* mRNA levels in male lambari pituitary glands incubated *in vitro* with different GnRH (cGnRH2) concentrations (10, 100, and 1000 nM) for 12 hours. Bars represent mean \pm standard error (SE) of the relative mRNA levels normalized with elongation factor 1 alpha (*ef1a*) and expressed as fold inductions relative to the control group. Different letters indicate significant differences between the groups ($p < 0.05$).

Figure 5. Relative expression of *fshb* and *lhb* mRNA levels in male lambari pituitary glands incubated *in vitro* with different GnIH (zf LPXRFa-3) concentrations (10, 100, and 1000 nM) for 12 hours. Bars represent mean \pm standard error (SE) of the relative mRNA levels normalized with elongation factor 1 alpha (*ef1a*) and expressed as fold inductions relative to the control group. Same letters indicate no significant differences between the groups ($p < 0.05$).

Figure 6. Relative expression of *fshb* and *lhb* mRNA levels in male lambari pituitary glands incubated *in vitro* with GnIH (zf LPXRFa-3) and GnRH (cGnRH2) at 100 nM concentration, separately and together for 12 hours. Bars represent mean \pm standard error (SE) of the relative mRNA levels normalized with elongation factor 1 alpha (*ef1a*) and expressed as fold inductions relative to the control group. Different letters indicate significant differences between the groups ($p < 0.05$).

Figure 7. Schematic representation summarizing the effects of GnRH and GnIH in the hypothalamic-pituitary axis of lambari. GnRH stimulates gonadotropin expression, increasing *fshb* and *lhb* mRNA levels in the gonadotropic cells. GnIH counteracts the GnRH-induced gonadotropin expression, inhibiting *fshb* and *lhb* mRNA levels. Stimulatory effects are represented by + and \downarrow ; inhibitory action is denoted by - and \perp .

Figures

Figure 1

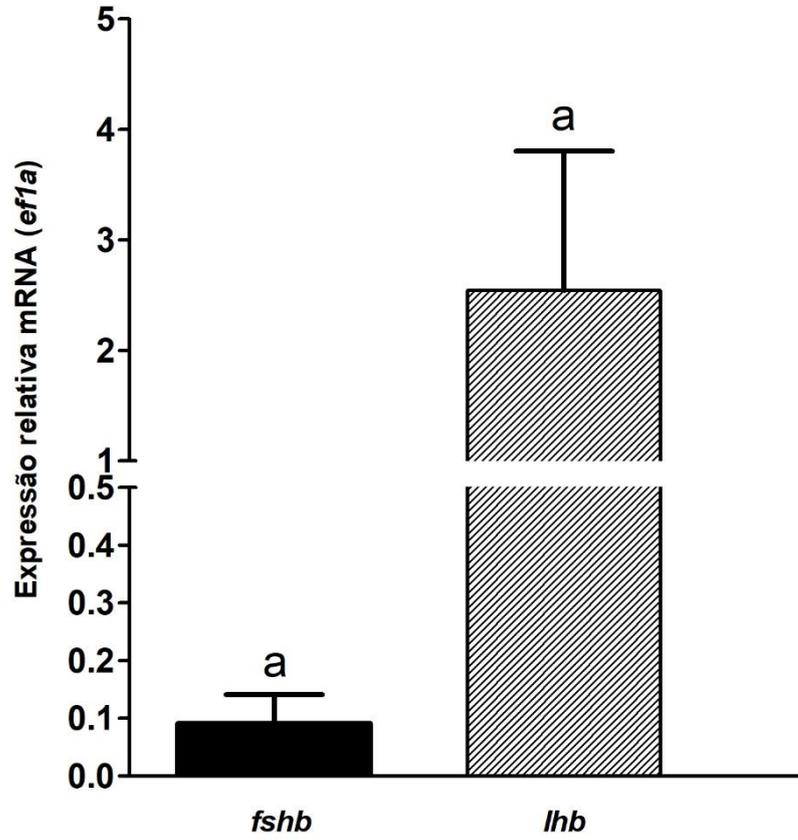


Figure 2

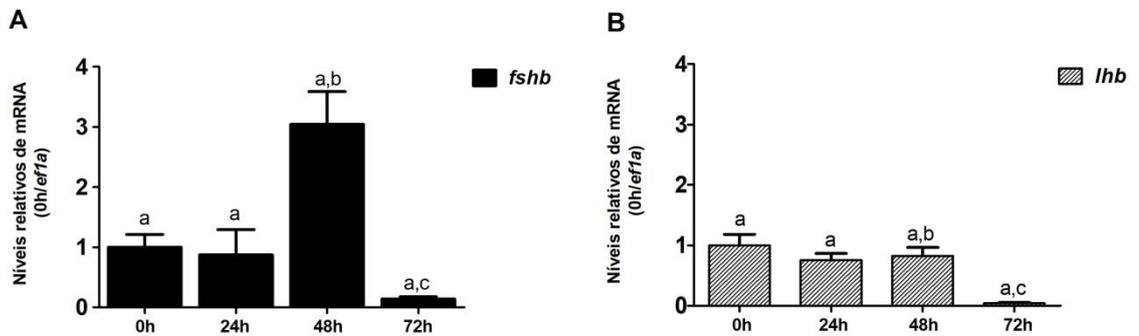


Figure 3

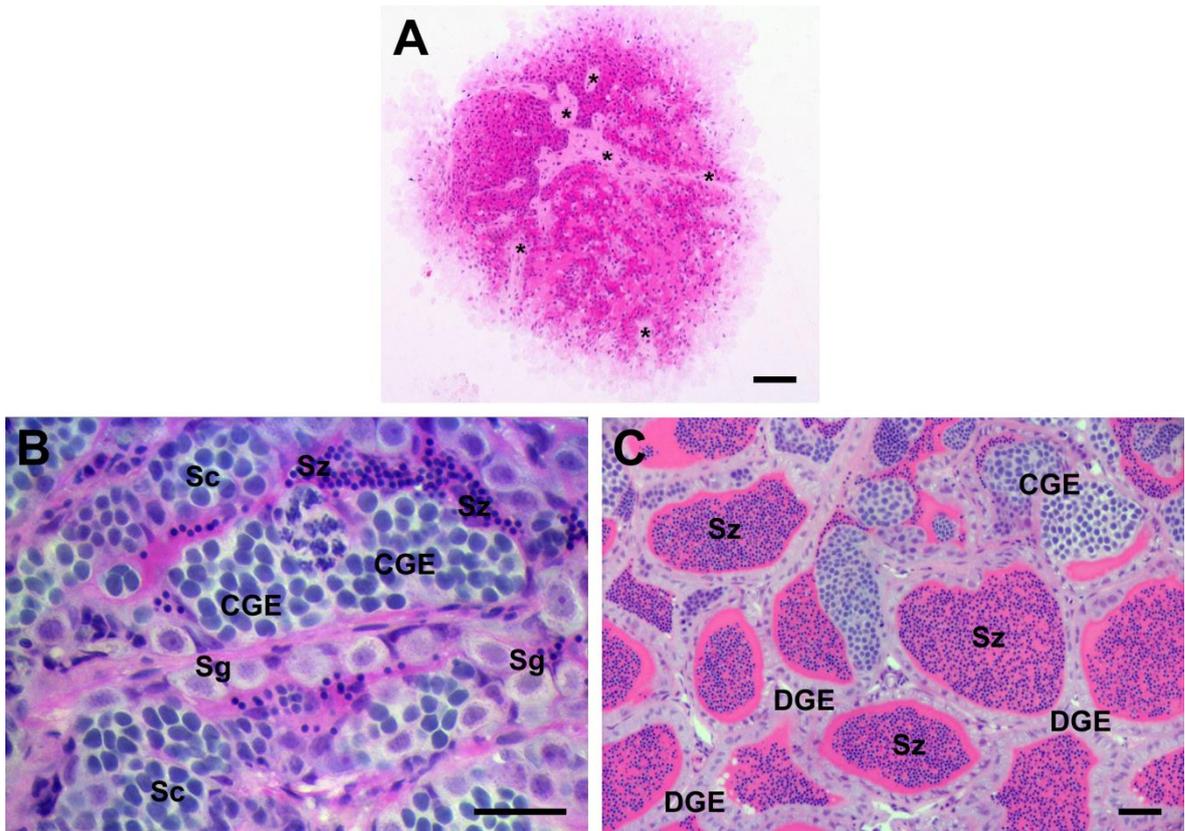


Figure 4

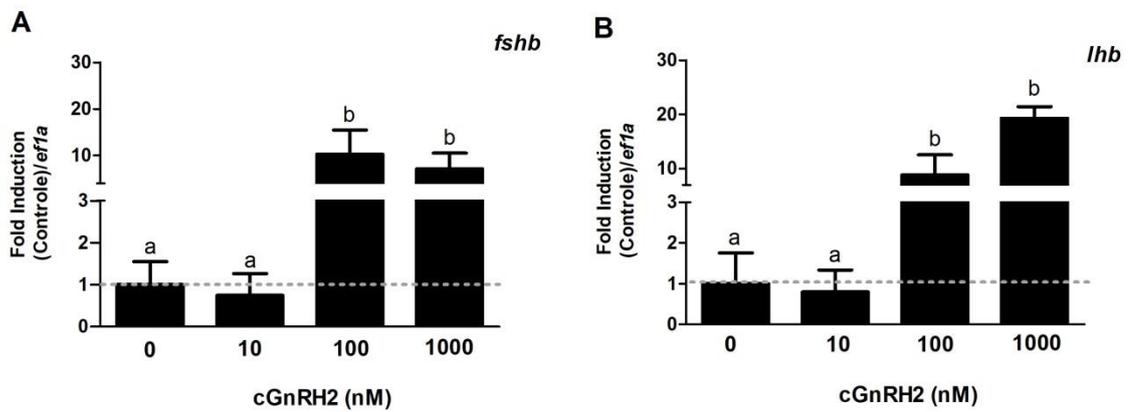


Figure 5

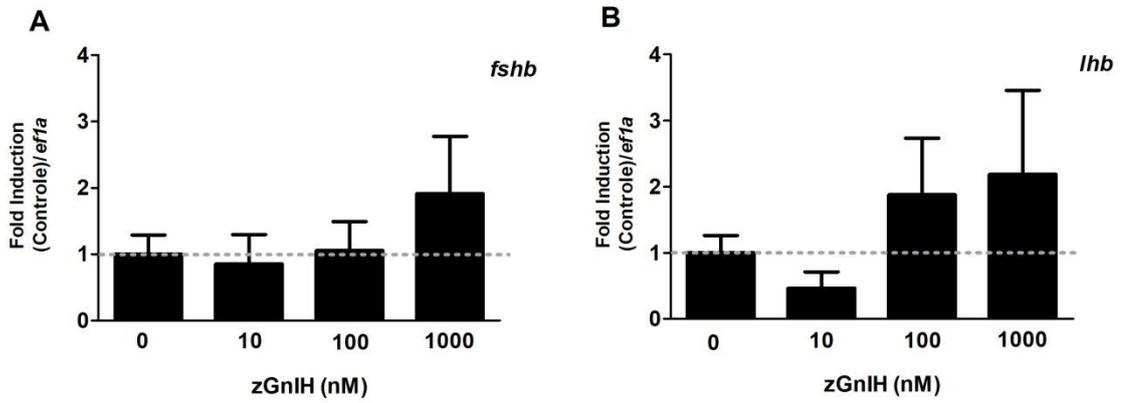


Figure 6

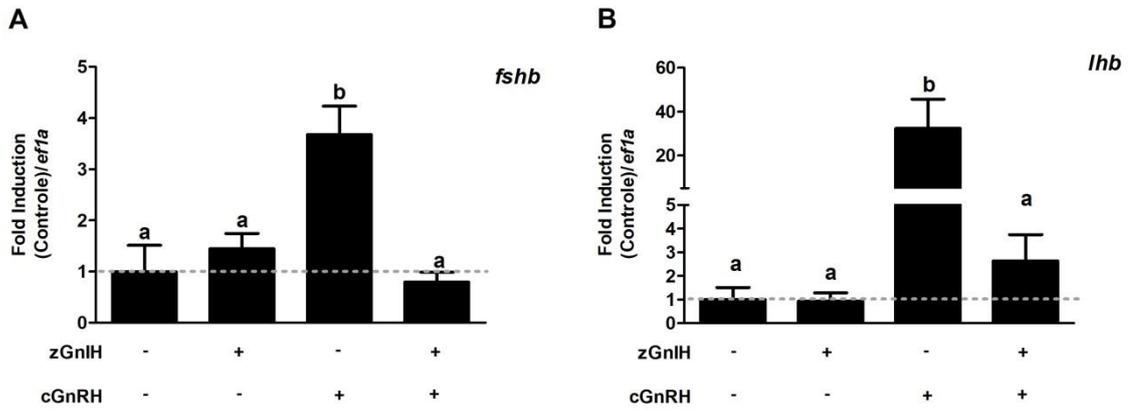
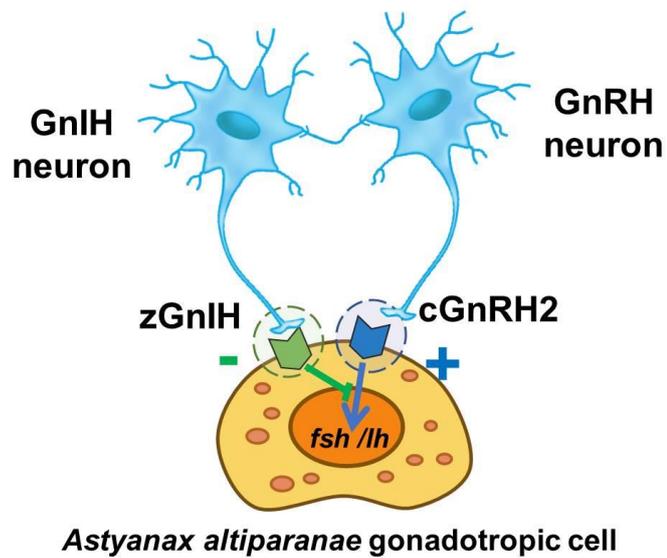


Figure 7



MANUSCRITO 2

Anti-inflamatórios não esteroidais como desreguladores endócrinos na hipófise e testículos de *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae)

Artigo a ser submetido para a Revista Chemosphere

Giovana Souza Branco^a, Carlos Eduardo Tolussi^b, Maria Ines Borella^c, Marília de Paiva Camargo^c, Marcela Muñoz Peñuela^d, Aline Dal'Olio Gomes^d, Renata Guimarães Moreira^d

^aAquaculture Center of São Paulo State University (CAUNESP), São Paulo State University (UNESP) - Jaboticabal Campus, Jaboticabal, Brazil.

^bUniversidade Anhembi Morumbi, São Paulo, SP, Brazil

^cLaboratório de Endocrinologia de Peixes, Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^dLaboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Resumo

Diversos compostos farmacêuticos atuam como desreguladores endócrinos (DE), interferindo em vários processos fisiológicos, como a reprodução. Nos peixes, a integração de fatores ambientais abióticos e condições fisiológicas favoráveis resulta na secreção hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), que estimula as células gonadotrópicas da adeno-hipófise a sintetizar e liberar as gonadotropinas, hormônio folículo estimulante (Fsh) e hormônio luteinizante (Lh), que por sua vez agem sobre as gônadas, estimulando a produção de esteroides gonadais (estradiol, testosterona e 11 cetotestosterona). O objetivo deste estudo foi investigar se há influência de diferentes concentrações de diclofenaco (DCF) e ibuprofeno (IBU) na expressão gênica das gonadotropinas e liberação de esteroides gonadais *in vitro*. Os explantes de hipófise e testículos foram mantidos por 12 horas em meio de Leibovitz (L-15) suplementado em diferentes tratamentos: controle positivo - L-15 com GnRH 100 nM (para hipófise) e L-15 com 10 UI/mL de hCG (para testículo); e o meio com controle positivo e diferentes concentrações de 0,1, 1, 10, 100 e 1000 ng/L de DCF e IBU. Após esse período, cada hipófise foi coletada e foi realizada a análise de expressão gênica, avaliando os níveis relativos de mRNA de *fshb* e *lhb*, e o meio testicular foi coletado para análise da concentração de esteroides. Tanto o DCF quanto o IBU foram capazes de diminuir a expressão gênica de *fshb* e *lhb* nas hipófises em

todas as concentrações testadas, mesmo em concentrações muito baixas, como 0,1 ng/L e sem uma razão dose-resposta, evidenciando um efeito inibitório. Nos testículos, o DCF não alterou os níveis de estradiol, testosterona e 11 cetotestosterona, enquanto o IBU foi capaz de diminuir os níveis de testosterona e estradiol, mesmo em baixas concentrações, mostrando uma resposta inibitória dos testículos. Esses resultados demonstram que estes AINEs podem interferir na reprodução dos peixes, e mesmo em doses baixas podem ser considerados DEs, principalmente o IBU, podendo interferir na gametogênese desta espécie neotropical.

Palavras-chave: *in vitro*, diclofenaco, ibuprofeno, reprodução, gonadotropinas, esteroides.

1. Introdução

Como consequência da intervenção humana houve um aumento na disponibilidade de uma gama de compostos químicos (Zagatto, 2006) nos ambientes aquáticos, que são potencialmente tóxicos para o ecossistema, além de apresentarem o potencial de interferir na vida aquática. Nos organismos, os compostos químicos são capazes de modificar os mecanismos fisiológicos, como por exemplo, na reprodução (Flippin *et al.*, 2007; Van den Brandhof e Montforts, 2010), agindo em eventos críticos e essenciais para a manutenção de uma população, como na produção e desenvolvimento de espermatozoides (Villeneuve *et al.*, 2007; Martinovic-Weigelt *et al.*, 2011), que é essencial para garantir a fertilização dos oócitos.

Diversos são os grupos de compostos encontrados nos corpos aquáticos, sendo que uma grande parte desses é classificada como desreguladores endócrinos (DE), que são uma categoria de poluentes ambientais capazes de interferir nas funções do sistema endócrino (Bila e Dezotti, 2007). Mesmo em pequenas quantidades, esses compostos são capazes de interferir na síntese, secreção, transporte e ação dos hormônios secretados naturalmente pelos

organismos que, por exemplo, fazem parte da reprodução dos animais (Nishi *et al.*, 2002). A interferência dos DE sobre os hormônios reprodutivos pode ser relacionada com efeitos diretos nas gônadas, ou ainda, na glândula hipófise que é responsável por sintetizar e liberar as gonadotropinas, que por sua vez atuam nas gônadas estimulando a produção de esteroides gonadais e conseqüentemente na maturação e liberação dos gametas (Wang *et al.*, 2018). Desta forma os compostos podem causar um efeito cascata na produção dos gametas.

Dentre os compostos capazes de interferir na reprodução dos organismos, estão os contaminantes emergentes, podem ter um potencial risco para os seres humanos e para o meio ambiente. No entanto, a maioria desses compostos ainda não possui um monitoramento regular e uma legislação precisa quanto à sua concentração nos corpos aquáticos (Farré *et al.*, 2008; Geissen *et al.*, 2015; Quadra *et al.*, 2017). Dentre eles, destacam-se substâncias como drogas de uso abusivo, produtos de cuidados pessoais, hormônios esteroides, surfactantes, aditivos industriais e agentes farmacêuticos (Richardson *et al.*, 2007).

Para os fármacos, destaca-se um grupo de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que tem como função principal a inibição da enzima cicloxigenase (COX) e conseqüente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (Hoeger *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2008), dentre eles destacam-se o diclofenaco e o ibuprofeno, que são amplamente prescritos por médicos e utilizados pela população, principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios músculo-esqueléticos (Batlouni, 2010). Estes fármacos estão disponíveis em várias formas de administração, e tem meia-vida de eliminação relativamente curta.

O aumento do consumo desses AINEs é crescente e preocupante, pois uma das conseqüências é a elevação da sua concentração no ambiente aquático. Esses fármacos chegam ao ambiente aquático ou por descarte incorreto, ou ainda como metabólitos humanos eliminados após o uso desses medicamentos (Marsik *et al.*, 2017). Agravado pela limitada remoção nas estações de tratamento de esgotos (Santos *et al.*, 2010; Locatelli *et al.*, 2011; Montagner *et al.*, 2014), os

AINEs podem persistir tempo suficiente para atingir os sistemas de água de abastecimento (Cunningham *et al.*, 2009).

Diante desta realidade, Montagner *et al.* (2017) e Quadra *et al.* (2017), revisaram diversos trabalhos que apontavam as concentrações de fármacos em diferentes corpos hídricos do Brasil, com o diclofenaco em águas superficiais e de esgotos bruto e tratado em concentrações sendo encontrado entre 9 e 1.600 ng/L e mais especificamente na região sudeste, destaca-se um estudo no reservatório Billings que apresentou concentrações de 8,1 a 394,5 ng/L nas várias regiões desta represa e em relação ao ibuprofeno de 10 a 78,2 ng/L (Almeida e Weber, 2005).

Quando se busca avaliar os efeitos dos poluentes nos organismos aquáticos existem alguns fatos que devem ser levados em consideração, o primeiro é que nos sistemas aquáticos naturais, os organismos estão expostos a diversos compostos que podem levar a interações toxicológicas, apresentando uma resposta biológica diferente da ação dos compostos isolados (Rand *et al.*, 1995), podendo produzir efeitos sinérgicos, de potenciação, antagônicos e aditivos (Beyer *et al.*, 2014; Mozeto *et al.*, 2006). Os testes de toxicidade em laboratório, normalmente são realizados com substâncias isoladas, negligenciando o potencial efeito da mistura dos compostos, o que pode subestimar a avaliação de forma mais concreta dos efeitos adversos dos poluentes no ambiente natural (Beyer *et al.*, 2014). Outro fator que vale ser destacado é que, tanto no ambiente natural como em experimentos laboratoriais, o manuseio pode interferir no processo de estresse dos animais, acarretando alterações nos níveis hormonais circulantes, podendo mascarar os efeitos dos contaminantes na concentração plasmática destes hormônios (McMaster *et al.* 1994).

O estudo *in vitro* é uma ferramenta que pode ser utilizada para monitorar os impactos reprodutivos em peixes expostos a contaminantes químicos. Dentre as vantagens desses estudos, destaca-se a resposta a uma questão inicial, que é reconhecer o efeito direto, eliminando efeitos adversos, permitindo a manipulação da fisiologia reprodutiva para isolar e identificar mecanismos de impacto

(McMaster *et al.*, 1995), de forma rápida, conhecendo as propriedades dos compostos (Morgado e Jordão, 2016).

Com base no exposto, fica destacado que o estudo *in vitro* para estimar o potencial de síntese de gonadotropinas pela hipófise e a produção de esteroides pelas gônadas, representa um método para detectar os impactos da exposição a contaminantes na reprodução dos peixes (McMaster *et al.*, 1995). Desta forma, diante da complexidade do processo reprodutivo e do aumento da concentração de poluentes no ambiente aquático, o objetivo desse trabalho foi estudar a interferência *in vitro* de diclofenaco e do ibuprofeno no eixo reprodutivo de uma espécie de peixe de interesse econômico, *Astyanax altiparanae*, investigando se estes fármacos podem interferir, de forma isolada e/ou combinada, no processo de síntese dos hormônios gonadotrópicos (Fsh e Lh) e liberação dos hormônios esteroides 17 β -estradiol (E2), testosterona (T) e 11 cetotestosterona (11-KT).

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Exemplares machos adultos de *Astyanax altiparanae* foram cedidos pela Estação de Piscicultura da Companhia Elétrica do Estado de São Paulo (CESP), município de Paraibuna, São Paulo (23°24'47"S, 45°36'7"W). Os animais foram transportados para o biotério do Laboratório de Endocrinologia de Peixes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Os animais foram acondicionados em caixas escuras com capacidade de 72 L por 7 dias antes de qualquer manipulação experimental, com fotoperíodo controlado.

Todo o procedimento experimental usado estava de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA Protocolo #104) do Instituto de Ciências Biomédicas e dentro da legislação do CONCEA, e a espécie foi confirmada com

base em animais depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP 113746).

2.2 Delineamento experimental do explante da hipófise

Para avaliar a regulação *in vitro* das gonadotropinas, foi utilizado o sistema de explante de hipófises de acordo com os protocolos já padronizados por Branco *et al.* (2019), em que foram testados diferentes tempos de incubação da hipófise em meio de cultura Leibovitz L-15, para essa mesma espécie. Machos no mesmo estágio reprodutivo (n = 7 por tratamento) foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1 g/L) e então procedida a biometria dos mesmos, mensurando o comprimento total e comprimento padrão (cm) e a massa corpórea (g), utilizando-se uma balança com precisão de 0,001g.

A medula espinhal de cada animal foi seccionada, e feita a separação da cabeça do corpo do animal, na cabeça as hipófises foram dissecadas, a cavidades celomática foi exposta e os testículos dissecados. Cada hipófise foi cultivada em placa de 96 *wells*, 1 hipófise por *well*, com 200uL de meio de cultura Leibovitz L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 12 horas a 26°C.

Em todos os experimentos com hipófise, utilizamos como controle negativo somente o meio de cultura (L-15) e como controle positivo o meio L-15 contendo 100 nM de GnRH, para estimular a síntese dos hormônios gonadotrópicos, e assim, avaliar a expressão de mRNA. No primeiro experimento, foram utilizadas diferentes concentrações de diclofenaco (Sigma D6899), no segundo de ibuprofeno (Sigma I4883), e no terceiro, a mistura dos fármacos (Figura 1). As concentrações escolhidas respeitaram a faixa da concentração de fármacos encontrada nos corpos d'água nacionais. Os experimentos foram:

Experimento 1 – Meio L-15 + 100 nM de GnRH + diferentes concentrações de diclofenaco (0,1; 1; 10, 100, 1000 ng/L);

Experimento 2 - Meio L-15 + 100 nM de GnRH + diferentes concentrações de ibuprofeno (0,1; 1; 10, 100, 1000 ng/L);

Experimento 3 – Meio L-15 + 100 nM de GnRH + mistura (MIST) de diclofenaco e ibuprofeno (na proporção 1:1) em diferentes concentrações (0,1; 1; 10, 100, 1000 ng/L).

2.3 Análise da expressão gênica

O RNA total de cada hipófise foi extraído usando Mini Kit PureLink® RNA (Código 12183018A) e a concentração (ng/μl) foi avaliada usando um espectrofotômetro *NanoDrop One* (ThermoFisher). As amostras obtidas foram tratadas com DNase para eliminar o DNA genômico seguindo procedimentos padrão. Após a verificação da integridade do RNA, o cDNA foi sintetizado usando Transcriptase Reversa Superscript II Kit (ThermoFisher) de acordo com as instruções do fabricante.

Para avaliar a expressão das gonadotropinas (*fshb* e *lhb*), reações de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizadas em *StepOne Plus* (Applied Biosystems). Para tanto, *primers* (*forward* e *reverse*) foram utilizados com base em sequências específicas de Fsh e Lh de *A. altiparanae* (Tabela 1), que foram descritos por Jesus *et al.*, (2017). As reações foram realizadas usando SYBR Green® (Applied Biosystem), 10 uL e 125 nM para cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*) e 100 ng de cDNA total. O fator de alongação 1 alfa (*elfa1*) foi usado como gene endógeno de referência. Os Cts foram determinados usando um Sistema de PCR em tempo real – *Step One Plus* (Applied Biosystems). As reações foram de 10 min a 95°C (fase de manutenção), 15 s a 95°C, seguido de 1 min a 60°C (40 ciclos de desnaturação - fase de ciclagem), seguido de uma fusão curva de 60 a 95. Os níveis relativos de mRNA dos genes alvo foram determinados pelo método 2⁻ ($\Delta\Delta CT$), no qual a expressão dos genes estudados foi normalizado usando *elfa1* como gene de referência e subsequentemente calibrado para os valores de expressão do grupo controle positivo.

2.4 Padronização do explante de fragmentos de testículos

Para avaliar a resposta endócrina dos fragmentos de testículos *in vitro*, foram realizados diferentes experimentos utilizando um sistema de explante com fragmentos de testículo. Inicialmente, o sistema *in vitro* de explante de testículo foi realizado de acordo com Leal *et al.*, (2009) (Figura 2). Foram preparados cilindros de agarose com solução de Ringer e agarose, ambos autoclavados, utilizando uma placa de 48 *wells* como molde. Em seguida, os cilindros de agarose foram posicionados em uma placa de 24 *wells* e os fragmentos de testículos de 5 a 6 mg (n=6) colocados sob uma membrana de nitrocelulose (0,22 μ m, 25 mm, Millipore, Billerica, MA, USA), imersos em 1 mL de meio de cultura L-15 suplementado com Fungizone, Penicilina/Streptomicina, HEPES e BSA e pH 7.4 em incubadora a 26 °C.

Para avaliar a viabilidade do experimento, o meio de cultura foi utilizado na ausência e na presença de hCG (Chorionic gonadotropin human – Merck 9002-61-3) em três diferentes concentrações, para estimular a síntese e liberação dos esteroides gonadais pelos fragmentos de testículo, no meio de cultura L-15. Os tratamentos foram (Figura 3):

- (A) Controle negativo somente com o meio L-15;
- (B) 1 IU/mL de hCG;
- (C) 10 IU/mL de hCG;
- (D) 100 IU/mL de hCG.

Após as 12 horas, os testículos e o meio de cultura foram coletados, congelados em gelo seco e armazenados em freezer - 80 °C até sua utilização.

Em um segundo momento, com base nos resultados obtidos, foi realizada outra metodologia do explante de testículo, similar ao padronizado para as hipófises. Os testículos (n = 8 por tratamento) foram pesados e acondicionados em placa de petri estéril com meio de cultura L-15 suplementado para serem fragmentados em 21 pedaços. Cada fragmento tinha cerca de 5 a 6 mg e a cada 3 fragmentos foram mantidos em 3 poços diretamente com 200 μ L de meio de cultura Leibovitz (L-15) por tratamento com diferentes dosagens de hCG, em placa de 96 *wells*. Buscando padronizar qual dosagem de hCG *in vitro*,

apresentava melhor efeito sobre os esteroides gonadais, liberados pelos fragmentos de testículo, no meio de cultura L-15, foram estabelecidos os seguintes tratamentos (Figura 4):

- (A) Controle negativo somente com o meio L-15;
- (B) 0,05 IU/mL de hCG;
- (C) 0,50 IU/mL de hCG;
- (D) 1 IU/mL de hCG;
- (E) 5 IU/mL de hCG;
- (F) 10 IU/mL de hCG;
- (G) 100 IU/mL de hCG.

Após 12 horas, o meio de cultura foi coletado de cada poço e feito um *pool* a cada 3 poços, armazenados em um mesmo eppendorf[®] totalizando 600 uL de meio, liberados por 3 fragmentos diferentes do testículo de um mesmo animal. Em seguida o meio foi congelado em gelo seco e armazenado em freezer - 80 °C até a utilização.

Depois de analisar os resultados obtidos, optamos por realizar um terceiro experimento, no mesmo mês em que seria o experimento do explante com os fármacos, para utilizar animais nas mesmas condições fisiológicas e estágio de maturação. Seguimos a mesma metodologia descrita anteriormente (n = 8 por tratamento), e os testículos foram pesados e acondicionados em placa de petri estéril com meio de cultura L-15 suplementado para serem fragmentados em 18 pedaços. Cada fragmento tinha cerca de 5 a 6 mg e cada 3 fragmentos foram mantidos em 3 poços em placa de cultura de 96 *wells*, diretamente com 200 uL de meio de cultura Leibovitz (L-15) por tratamento, com diferentes dosagens de hCG. Os tratamentos foram:

- (1) controle negativo somente com o meio L-15; (2) 0,05 IU/mL; (3) 0,10 IU/mL; (4) 0,50 IU/mL; (5) 1 IU/mL; (6) 10 IU/mL (Figura 5).

Após 12 horas, o meio de cultura foi coletado de cada poço e feito um *pool* a cada 3 poços, armazenados em um mesmo eppendorf, totalizando 600 uL de meio, liberados por 3 fragmentos diferentes do testículo de um mesmo animal. O

meio foi congelado em gelo seco e armazenado em freezer - 80 °C até a utilização.

2.5 Delineamento experimental do explante de testículo sob ação de anti-inflamatórios

Para avaliar a síntese dos esteroides gonadais liberados pelos fragmentos de testículo *in vitro*, foi utilizado o sistema de explante de testículo padronizado no terceiro experimento. Machos no mesmo estágio reprodutivo (n = 10 por tratamento) foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1 g/L), a medula espinhal de cada animal foi seccionada, a cavidade celomática foi exposta e os testículos dissecados. Esses foram pesados, acondicionados em placa de petri estéril com meio de cultura L-15 suplementado e fragmentados em 21 pedaços. Cada fragmentado tinha cerca de 5 mg e a cada 3 fragmentos foram mantidos em 3 poços com 200 uL de meio de cultura Leibovitz (L-15) por tratamento.

Utilizamos como controle negativo somente o meio de cultura (L-15), como controle positivo o meio L-15 contendo 10 IU/mL de hCG, para estimular a síntese dos hormônios esteroides e assim, avaliar a liberação e destes no meio de cultura, com diferentes concentrações de diclofenaco (Sigma D6899) e ibuprofeno (Sigma I4883). Os tratamentos foram (Figura 6):

- (1) controle negativo somente com o meio L-15;
- (2) controle positivo L-15 + 10 IU/mL de hCG;
- (3) Meio L-15 + 10 IU/mL de hCG + diferentes concentrações de diclofenaco (0,1; 1; 10, 100, 1000 ng/L);
- (4) Meio L-15 + 10 IU/mL de hCG + diferentes concentrações de ibuprofeno (0,1; 1; 10, 100, 1000 ng/L);

2.6 Análise dos esteroides

As proteínas do meio de cultura foram precipitadas com éter etílico, homogenizadas em vórtex por 30 segundos e centrifugadas a 1.800 rpm por 9 minutos a 4°C. Logo após serem centrifugadas, as amostras foram colocadas em

freezer -80°C por 7 minutos, para garantir que toda proteína fosse decantada. Por fim, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, seco com nitrogênio e estocado a 4°C até a sua utilização.

Os esteroides gonadais: 17 β -estradiol (E2), testosterona (T) e 11 cetotestosterona (11-KT) foram quantificados no meio de cultura pelo método de elisaimunoensaio (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA), com o uso de kits comerciais de acordo com as especificações técnicas do fabricante (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). As leituras foram realizadas em microplacas no espectrofotômetro Spectra Max (Molecular Devices), sendo 412 nm para 11-KT, 405 nm para T, 414 nm para E2. O limite de detecção do ensaio foi 10.000 pg/ml para E2, 500 pg/ml para T e 1000 pg/mL para 11-KT.

As amostras foram testadas puras, e quando as concentrações ficaram acima da curva padrão foi necessária a diluição, o que ocorreu somente no experimento com ibuprofeno, para dosagem de 11-KT, na qual as amostras de meio de cultura foram diluídas em 1:4 com o tampão ELISA Buffer (Cayman Chemical). As amostras foram dosadas em duplicata de acordo com instruções do fabricante.

2.7 Histologia

Foram realizadas duas análises histológicas, na primeira foram coletados todos os testículos dos animais utilizados no estudo do explante da hipófise, a fim de confirmar o estágio de maturação em que se encontravam e separar algum animal da análise, caso não estivesse no mesmo estágio. Na segunda análise, os fragmentos de testículo foram mantidos em meio de cultura por 12 horas com cerca de 5 a 6 mg e processados para análise histológica a fim de confirmar a integridade do tecido.

Os testículos foram dissecados, fragmentados e fixados em “Karnovsky” (solução de 4% paraformaldeído e 2% glutaraldeído em tampão fosfato Sorensen, 0,1 M a pH 7,2) por 24 horas para posterior processamento histológico. Foram incluídos em resina Leica® (Código: 7592), seccionados com 3 μ m de espessura

em micrótomo Leica Surgipath DB80LS, e corados em Hematoxilina e Eosina para análise e fotodocumentação.

2.8 Análise estatística

Os resultados da expressão gênica das gonadotropinas foram expressos como média \pm erro padrão (EP). As diferenças entre os dois grupos (controle positivo X controle negativo / sem GnRH X com GnRH) foram identificadas usando-se teste t de *Student* ($p < 0,05$). Comparações entre as médias (tratamento controle positivo X tratamentos) foram realizadas utilizando o teste ANOVA *one-way*, com teste de *Kruskal-Wallis* seguido de pós teste de *Dunns* ($p < 0,05$).

Nos experimentos de padronização do explante de fragmentos de testículos, os resultados da análise dos esteroides foram expressos como média \pm erro padrão (EP). No primeiro experimento, os dados não apresentavam uma distribuição normal, então, as comparações entre as médias dos tratamentos com hCG foram realizadas utilizando o teste ANOVA *one-way*, com teste de *Kruskal-Wallis* seguido de pós teste de *Dunns* ($p < 0,05$). No segundo e terceiro experimentos da padronização, os dados apresentaram distribuição normal e as comparações entre as médias dos tratamentos foram realizadas utilizando o teste de análise de variância ANOVA *one-way*, seguido de pós teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$).

Nos experimentos dos efeitos do diclofenaco e ibuprofeno na regulação dos esteroides gonadais, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (EP). As diferenças entre os dois grupos (controle positivo X controle negativo/ sem hCG X com hCG) foram identificadas usando-se teste t de *Student* ($p < 0,05$). Comparações entre as médias (tratamento controle positivo X tratamentos) foram realizadas utilizando o teste ANOVA *one-way*, seguido de pós teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$).

O *software* Prisma GraphPad, a versão 4.0 foi utilizado para todas as análises estatísticas.

3. Resultados

3.1 Efeitos do diclofenaco e ibuprofeno na expressão de gonadotropinas

Os resultados de expressão das gonadotropinas sob efeito do diclofenaco mostraram que nas dosagens de 1.000 e 10 ng/L, o mRNA do *fshb* foi inibido significativamente, mesmo na presença de cGnRH2, 10 ng/L de diclofenaco também teve efeito inibitório sob o mRNA do *lhb*, assim como, 100 ng/L (Figura 7).

Em relação ao ibuprofeno, foi observado que a menor dose 0,1 ng/L, teve efeito inibitório sobre a expressão dos mRNAs *fshb* e *lhb* e as dosagens de 1 e 100 ng/L apresentaram efeito inibitório sob a expressão de *fshb* (Figura 8).

Para as hipófises tratadas com a mistura dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), a ação combinada apresentou o inibição do mRNAs de *fshb* nas dosagens de 10 e 100 ng/L e inibiu significativamente o mRNAs de *lhb* nas dosagens de 10 e 1.000 ng/L (Figura 9).

3.2 Padronização do explante de fragmentos de testículos

A concentração de T e 11-KT liberadas no meio de cultura, pelos fragmentos de testículo, foram muito baixas, quase não detectáveis, porém, a concentração de 100 IU/mL de hCG estimulou a produção *in vitro* de T (Figura 10).

No segundo experimento, a dose de 10 IU/mL de hCG foi capaz de estimular a produção *in vitro* de 11-KT. No entanto, nenhuma dose de hCG utilizada nesse estudo estimulou a liberação de T e E2 pelos fragmentos de testículos de *A. altiparanae* (Figura 11).

No terceiro experimento de dose/ resposta do hCG, utilizando um número menor de concentrações e animais do mesmo lote e no mesmo mês dos experimentos com anti-inflamatórios, os resultados para 11-KT e para T mostraram que a dose de 10 IU/mL foi capaz de estimular a produção *in vitro*

destes andrógenos. No entanto, nenhuma dose de hCG foi capaz de estimular a liberação de E2 pelos fragmentos de testículo (Figura 12).

3.3 Efeitos do diclofenaco e ibuprofeno na regulação dos esteroides gonadais

Os resultados mostram que em relação à exposição ao diclofenaco, independente da concentração utilizada, os níveis dos esteroides gonadais no meio de cultura em que o fragmento de testículo foi exposto, não foi alterada tanto para E2, como para T e 11-KT (Figuras 13). Por outro lado, todas as doses de ibuprofeno inibiram a produção de E2, as doses 1, 10 e 100 ng/L apresentaram efeito inibitório sob a produção de T e nenhuma dose de ibuprofeno alterou a concentração de 11-KT no meio de cultura em que o fragmento de testículo foi exposto por 12 horas (Figura 14).

3.4 Histologia dos testículos dos animais do explante da hipófise

A análise morfológica dos testículos de *A. altiparanae* utilizados nos explante de hipófise mostrou que os animais estavam na fase reprodutiva denominada, aptos à reprodução e subfase epitélio germinativo médio, ou seja, o animal está fisiologicamente preparado para reproduzir. Todos os estágios da espermatogênese estão presentes; o epitélio germinativo (EG) pode ser contínuo ou descontínuo; os testículos são grandes e firmes, sendo que os espermatozoides são detectados no lúmen dos túbulos ou nos ductos espermáticos (Figura 15).

3.5 Histologia dos testículos expostos aos fármacos

Mesmo após 12 horas de exposição, os fragmentos de testículo cultivados estavam íntegros e possuíam a mesma coloração. A histologia mostrou que os animais estavam na fase reprodutiva denominada apto à reprodução e subfase epitélio germinativo final, ou seja, o animal já completou o desenvolvimento gonadal e são detectados muitos espermatozoides no lúmen dos lóbulos ou nos ductos espermáticos (Figura 16).

4. Discussão

Os anti-inflamatórios ibuprofeno e diclofenaco apresentaram efeitos no eixo HHG, desencadeando disfunções tanto na expressão gênica de gonadotropinas hipofisárias quanto na liberação de esteroides nos testículos. Mais especificamente, ambos os fármacos, isolados e misturados em diferentes concentrações inibiram a resposta de expressão de *fshb* e *lhb* ao GnRH e o ibuprofeno isolado alterou a liberação de T e E2 por fragmentos de testículos *in vitro*.

A análise da expressão gênica das gonadotropinas hipofisárias ao longo do ciclo de *A. altiparanae* em cativeiro demonstra um pico de *fshb* em um dos meses da estação reprodutiva (Jesus *et al.*, 2017). Com base nesta informação fica evidente a importância em selecionar espécimes que se encontram no mesmo estágio de maturação gonadal, uma vez que os indivíduos de espécies de desova parcelada podem estar em diferentes estágios de maturação gonadal na mesma estação do ano (Weber *et al.*, 2019).

Apenas coletando tecidos de animais no mesmo período reprodutivo é possível desenvolver estudos laboratoriais comparativos. Esta condição foi considerada neste trabalho, para que todas as hipófises sejam aquelas submetidas aos tratamentos controle (positivo e negativo) ou aos diferentes fármacos, apresentassem a mesma condição fisiológica inicial, tal fato foi confirmado com as análises histológicas, para confirmar o estágio de maturação gonadal de cada macho analisado nesse estudo.

Em relação às análises dos efeitos dos fármacos sob o eixo reprodutivo de *A. altiparanae*, analisando a parte superior do eixo, nas análises de expressão gênica das gonadotropinas das hipófises que foram submetidas aos tratamentos com os anti-inflamatórios, neste trabalho observamos que tanto o ibuprofeno como o diclofenaco em diferentes dosagens (isolados e misturados) foram capazes de inibir a síntese das gonadotropinas em *A. altiparanae*.

É de extrema importância o conhecimento dos efeitos isolados dos compostos farmacêuticos, para que se possam entender as causas pontuais de desregulação endócrina. Ao se projetar estudos *in vitro*, busca-se investigar esses

parâmetros específicos para subsidiar interpretações sobre o efeito dos produtos farmacêuticos em peixes, tanto em experimentos *in vivo* (Fernandes *et al.*, 2011), como em amostragens do ambiente natural (Weber *et al.*, 2019). No entanto, é importante destacar que os estudos *in vivo* apresentam características mais integrativas e menos direta, mas o efeito destes fármacos pode ser o mesmo, ou seja, ação inibitória.

Em zebrafish, diferentes concentrações de ibuprofeno e diclofenaco inibiram a expressão de *fshb* e *lhb* em animais expostos por 14 dias (Ji *et al.*, 2013). Em tilápias, o diclofenaco nas doses de 1 e 100 ug/L reduziu a expressão gênica relativa de *lhb* em animais expostos por 80 dias após a eclosão (Gröner *et al.*, 2017). A inibição da expressão de gonadotropinas em hipófises expostas aos AINEs sugere um possível atraso na espermatogênese e na maturação (Ji *et al.*, 2013), já que as gonadotropinas estão no topo do eixo reprodutivo e atuam nas gônadas promovendo a maturação e espermiacão.

Os fármacos não necessariamente atuam da mesma forma nos diferentes níveis do eixo HHG. Em linhagem primária de células da hipófise de *Gadus morhua* L., mesmo quando ocorre a diminuição da expressão do gene do hormônio liberador das gonadotropinas (*gnrh2*) em resposta ao bisfenol A não necessariamente esta redução tem efeito direto e imediato na diminuição das gonadotropinas (Krogh *et al.*, 2019). Estes autores verificaram ainda que o inverso também ocorre, pois o composto tetrabromobisfenol A não alterou a expressão de *gnrh*, porém, a expressão das gonadotropinas foi alterada. Vale ressaltar que estes resultados foram obtidos em experimentos *in vitro* como o conduzido no presente estudo, nos quais o objetivo foi avaliar o efeito direto nos órgãos e não um efeito de interação entre os diferentes níveis do eixo, considerando que não existe mais a integração fisiológica dos diferentes sistemas dos animais.

A função principal dos AINEs é inibir a enzima COX (Corcoran *et al.*, 2010), efeito que foi observado em um estudo *in vivo*, em machos de *A. altiparanae* em exposição aguda ao diclofenaco (dados pessoais dos autores).

No presente trabalho, podemos observar que o diclofenaco e o ibuprofeno tiveram efeito, inibindo as gonadotropinas, porém, ao que se sabe, ainda não foi descrito na literatura, qual o mecanismo de ação dos AINEs sobre as

gonadotropinas, ou seja, qual a via enzimática ou proteica na qual estes AINEs interferem, levando à inibição do *fshb* e *lhb*.

Antes de avaliar a ação dos anti-inflamatórios na produção e liberação dos esteroides por fragmentos de testículos, foi realizada uma padronização da dose de hCG que melhor estimularia essa produção nessas condições. Com base em trabalhos já descritos na literatura, inicialmente foram testados se os fragmentos de testículo eram capazes de liberar os esteroides sexuais (Darawany *et al.*, 2016; Beitel *et al.*, 2014; McMaster *et al.*, 1995), para então conduzir trabalhos que revelassem o efeito de compostos na produção dos esteroides *in vitro*.

De maneira geral, em condições fisiológicas adequadas, a produção dos esteroides pelas células de Leydig é diretamente regulada pelas gonadotropinas, influenciando a espermatogênese, além dos comportamentos reprodutivos e características sexuais secundárias em machos (Schulz e Nóbrega, 2011). A dose de hCG que foi mais eficiente em estimular a produção e liberação dos esteroides em um primeiro momento não respondeu a nossa questão, mas posteriormente, pode-se observar que, para a 11KT existiu um padrão de resposta na dose de 10 IU/mL, estimulando a produção *in vitro*, resposta essa observada posteriormente também para a T. Por isso, optou-se por utilizar essa dose, juntamente com as diferentes concentrações de fármacos, e assim seria possível avaliar se, mesmo na presença de um efeito estimulatório (10 IU/mL de hCG), os fármacos seriam capazes de alterar a produção dos esteroides.

Nesse trabalho, o diclofenaco não alterou significativamente a liberação de esteroides gonadais pelos fragmentos testiculares. Porém, na literatura já foi descrito, que o diclofenaco *in vivo* é capaz de reduzir a concentração plasmática de T em *Hoplias malabaricus* (Guiloski *et al.*, 2015).

Na espécie deste estudo, *A. altiparanae*, a exposição aguda por 96 horas de machos a 3,08 mg/ L de DCF, foi capaz de reduzir os níveis de T e ainda, capaz de reduzir a concentração plasmática de E2 (Godoi *et al.*, 2020).

Em relação ao ibuprofeno, no presente estudo, ele inibiu a liberação de E2 por fragmentos de testículos, independentemente da dosagem e, nas doses de 1, 10 e 100 ng/L inibiu a liberação de T. Estes dados são corroborados pelo estudo conduzido com machos de zebrafish, no qual o ibuprofeno também foi capaz de

diminuir as concentrações plasmáticas de T após 14 dias de exposição *in vivo* à diferentes concentrações deste fármaco (Ji *et al.*, 2013). Adicionalmente, a exposição ao ibuprofeno não só aumentou a produção de E2 em medaka, como diminuiu a produção de T de maneira dose/dependente, diminuindo a atividade da aromatase nas células H295R (Han *et al.*, 2010).

Mesmo com esses resultados demonstrando o efeito do ibuprofeno como desregulador endócrino em fragmentos de testículos, é necessário ainda, conduzir experimentos com a combinação dos dois fármacos em questão, avaliando se o efeito combinado produz uma potencialização, por exemplo, da diminuição dos esteroides.

O papel de DEs na fisiologia reprodutiva de machos de teleósteos, em especial em espécies neotropicais vem sendo considerado relevante considerando a poluição dos ambientes aquáticos nestas regiões. Na mesma espécie deste estudo, alguns trabalhos vêm avaliando o efeito de metais, em especial o alumínio que tem efeito androgênico em machos em exposição aguda (Kida *et al.*, 2016) e causa danos nos espermatozoides (Pinheiro *et al.*, 2019). Adicionalmente, o manganês tem efeito estrogênico em machos desta espécie, também em exposição aguda (Kida *et al.*, 2016).

Em outra espécie neotropical, foi demonstrado o efeito do endosulfan, um pesticida organoclorado, como DE, apresentando efeito antiandrogênico, *in vitro*, mesmo na presença de Lh em machos de *Cichlasoma dimerus* (Da Cuña *et al.*, 2013).

Além disso, os AINEs podem alterar até mesmo, a expressão de enzimas esteroidogênicas essenciais, como *cyp17a1* e *cyp19* (Ji *et al.*, 2013). Alterações nas enzimas aromatase (*cyp*), que pertencem ao grupo molecular das enzimas do citocromo p450 e agem como mediadoras da aromatização de andrógenos em estrógenos podem influenciar a concentração e o equilíbrio dos hormônios sexuais (Uchida *et al.*, 2004).

Tanto as gonadotropinas como os esteroides sexuais desempenham um papel crucial na reprodução e, portanto, pequenas mudanças em seus níveis poderiam levar ao insucesso reprodutivo (Da Cuña *et al.*, 2016). No entanto, é interessante destacar que em ambientes naturais, quando o tratamento de água e

resíduos não são efetivos (Américo *et al.*, 2013) a presença destes anti-inflamatórios, dentre outros compostos é uma realidade, sugerindo riscos e impactos negativos na saúde e na reprodução das populações (Bisognin *et al.*, 2018), inclusive espécies com potencial para a aquicultura.

Como já mencionado a espécie em estudo possui uma importância comercial por ser de fácil cultivo, pode ser utilizada para consumo direto, para a industrialização em forma de conservas, como alimento de forragem na criação de peixes carnívoros, e ainda pode ser comercializada como isca viva para a pesca esportiva (Porto-Foresti *et al.*, 2005). Uma vez que nos ambientes naturais a presença dos fármacos na água pode interferir na reprodução dos organismos, medidas precisam ser tomadas tanto em âmbito da conscientização do descarte incorreto de medicamentos, como em relação às tecnologias de conservação da espécie, como por exemplo a produção em pisciculturas comerciais.

5. Conclusão

Em conclusão, ibuprofeno e diclofenaco, podem atuar como desreguladores endócrinos em machos de *A. altiparanae*, sendo que ambos AINEs são capazes de inibir a síntese das gonadotropinas *in vitro* e somente o ibuprofeno desencadeia a inibição da produção de E2 e T por fragmentos de testículos *in vitro*.

Referências

- ALMEIDA, G.A., WEBER, R.R., 2005. Fármacos na Represa Billings. Ver. Saúde e Amb. 6, 7–13.
- AMÉRICO, J.H.P., TORRES, N.H., AMÉRICO, G.H.P., CARVALHO, S.L. 2013. Ocorrência, destino e potenciais impactos dos fármacos no ambiente. SaBios: Rev. Saúde e Biol. 8, 2, 59-72.
- BATLOUNI, M., 2010. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. Arq. Bras. Cardiol. 94, 4, 522-529.
- BEITEL, S.C., DOERINGA, J.A., PATTERSONA, S.E., HECKER, M. 2014. Assessment of the sensitivity of three North American fish species to disruptors of steroidogenesis using *in vitro* tissue explants. Aquat. Toxicol. 152, 273–283.
- BEYER, J., PETERSEN, K., SONG, Y., RUUS, A., GRUNG, M., BAKKE, T., TOLLEFSEN, K.E., 2014. Environmental Risk Assessment of Combined Effects in Aquatic Ecotoxicology: A Discussion Paper. Mar. Environ. Res. 96, 81-91.
- BILA, D.M., DEZOTTI, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Quim. Nova. 30, 3, 651-666.
- BISOGNIN, R.P., WOLFF, D.B., CARISSIMI, E. 2018. Revisão sobre fármacos no ambiente. Rev. DAE | núm. 210 | vol. 66 | abril a junho de 2018.
- BRANCO, G.S., MELO, A. G., RICCI, J.M.B., DIGMAYER, M., JESUS, L.W.O., HABIBI. H.R., NÓBREGA, R.H. 2019. Effects of GnRH and the dual regulatory actions of GnIH in the pituitary explants and brain slices of *Astyanax altiparanae* males. Gen. and Comp. Endocrinol. 273, 209–217.
- Corcoran, J., Winter, MJ., Tyler, C.R. 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. Crit Rev Toxicol. 40:4, 287-304.
- CUNNINGHAM, V.L., BINKS, S.P., OLSON, M.J., 2009. Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. Regul. Toxicol. Pharmacol. 53, 1, 39-45.
- DA CUÑA, R.H., PANDOLFI, M., GENOVESE, G., PIAZZA, Y., ANSALDO, M., LO NOSTRO, F.L. 2013. Endocrine disruptive potential of endosulfan on the

reproductive axis of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquat. Toxicol.* 126, 299–305.

DA CUÑA, R.H., VÁZQUEZZ, G.R., DORELLE, L., RODRÍGUEZ, E.M., MOREIRA, R.G., LO NOSTRO, F.L. 2016. Mechanism of action of endosulfan as disruptor of gonadal steroidogenesis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 187, 74–80.

DARAWANY, A., MOUSTAFA, A., AL-MARAKBY, KHM, NASR, A., NAIEL, M.A., ALI ELEWA, Y.H. 2016. Effect of exogenous hormone treatments on spermatogenesis in male grey mullet out of the spawning season. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.*, 4(2), 297-302.

FARRÉ, M., PÉREZ, S., KANTIANI, L., BARCELÓ, D. 2008. Fate and Toxicity of Emerging Pollutants, their Metabolites and Transformation Products in the Aquatic Environment. *Trends Analyt Chem*, 27, 991–1007.

FERNANDES, D., SCHNELL, S., PORTE, C. 2011. Can pharmaceuticals interfere with the synthesis of active androgens in male fish? An *in vitro* study. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2250–2253.

FLIPPIN, J.L., HUGGETT, D., FORAN, C.M. 2007. Changes in the Timing of Reproduction Following Chronic Exposure to Ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 81, 73–78.

GEISSEN, V., MOLB, H., JUMPPC, E., UMLAUFD, G., NADALE, M., PLOEFA, M.V.D., VAN DE ZEEA S.E.A.T.M., RITSEMAA C.J., 2015. Emerging Pollutants in the Environment: a Challenge for Water Resource Management. *J I Soil and Water Conserv.* 3, 57–65.

GRÖNER, F., HÖHNE, C., KLEINER, W., KLOAS, W., 2017. Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere.* 166, 473-481.

GUILOSKI, I.C., RIBAS, J.L.C., PEREIRA, L.S., NEVES, A.P.P., ASSIS. H.C.S., 2015. Effects of Trophic Exposure to Dexamethasone and Diclofenac in Freshwater Fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 114, 204-211.

HAN, S., CHOI, K., KIM, J., JI, K., KIM, S., AHN, B., YUN, J., CHOI, K., KHIM, J.S., ZHANGE, X., GIESY, J.P. 2010. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat. Toxicol.* 98, 256–264.

HOEGER, B., KÖLLNER, B., DIETRICH, D.R., HITZFELD, B. 2015. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). *Aquat. Toxicol.* 75, 53-64.

JESUS, L.W.O., BOGERD, J., VIECELI, F.M., BRANCO, G.S., CAMARGO, M.P., CASSEL, M., MOREIRA, R.G., YAN, C.Y.I., BORELLA, M.I. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: Molecular characterization, spatiotemporal expression and their possible role on female reproductive dysfunction in captivity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 246, 150-163.

JI, K., LIU, X., LEE, S., KANG, S., KHO, Y., GIESY, J.P., CHOI, K., 2013. Effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Hormones and Genes of the Hypothalamic-Pituitary-Gonad Axis, and Reproduction of Zebrafish. *J. Hazard. Mater.* 254–255, 242–251.

KIDA, B.M.S., ABDALLA, R.P., MOREIRA, R.G. 2016. Effects of acidic water, aluminum, and manganese on testicular steroidogenesis in *Astyanax altiparanae*. *Fish Physiol Biochem.* 42, 1347–1356.

KROGH, K.V., ROPSTAD, E., NOURIZADEH-LILLABADI, R., HAUG, T.M., WELTZIEN, F.A. 2019. *In vitro* effects of Bisphenol A and Tetrabromobisphenol A on Cell Viability and Reproduction-Related Gene Expression in pituitaries from Sexually Maturing Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.). *Fishes*, 4, 48, doi:10.3390/fishes4030048.

LOCATELLI M.A.F., SODRÉ F.F., JARDIM, W.F., 2011. Determination of Antibiotics in Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 385–393.

MARSIK, P., REZEK, J., ZIDKOVÁ, M., KRAMULOVÁ, B., TAUCHEN, J., VANEK, T. 2017. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Watercourses of Elbe Basin in Czech Republic. *Chemosphere.* 171, 97-105.

MARTINOVIC-WEIGELTA, D., WANG, R.L., VILLENEUVEA, D.L., BENCICC, D.C., LAZORCHAKC, J., ANKLEYA, G.T. 2011. Gene expression profiling of the androgen receptor antagonists flutamide and vinclozolin in zebrafish (*Danio rerio*) gonads. *Aquat. Toxicol.* 101, 447–458.

MCMASTER, M.E., K.R. MUNKITTRICK, P.L. LUXON AND G.J. VAN DER KRAAK. 1994. Impact of low-level sampling stress on interpretation of physiological responses of white sucker exposed to effluent from a bleached kraft pulp mill. *Ecotox. Environ. Safe.* 27, 251-264.

MONTAGNER, C.C., VIDAL, C., ACAYABA, R.D. 2017. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do brasil: cenário atual e aspectos Analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Quim. Nova.* 40, 9, 1094-1110.

MONTAGNER C.C, JARDIM W.F., VON DER OHE, P.C., UMBUZEIRO, G.A., 2014. Occurrence and Potential Risk of Triclosan in Freshwaters of São Paulo, Brazil—the Need for Regulatory Actions. *Environ Sci Pollut Res.* 21, 1850–1858.

MONTEIRO, E.C.A, TRINDADE, J.M.F., DUARTE, A.L.B.P., CHAHADE, W.H. 2008. Os anti- inflamatórios não esteroidais (AINEs). *Temas de reumatologia clínica,* 9, 2, 53-63.

MORGADO, P.I., JORDÃO, L. 2016. A importância do uso de métodos complementares para a avaliação da toxicidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Observações_ Boletim Epidemiológico.* n. 16, 2ª série. Disponível em: http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/3895/1/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_N16_2016_artigo9.pdf

MOZETO, A.A., ZAGATTO, P.A. 2006. Introdução de agentes químicos no ambiente, in: Zagatto, P.A., Bertoletti, E. (Eds.), *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações- RiMa,* São Carlos, pp. 29-31.

NISHI, K., CHIKAE, M., HATANO, Y., MIZUKAMI, H., YAMASHITA, M., SAKAKIBARA, R., TAMIYA, E. 2002. Development and Application of a Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA for Quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) Vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 132, 161–169.

PASSONI, M.T. Efeitos da dipirona na esteroidogênese e nas atividades (anti) androgênicas mediadas por receptores *in vitro* e *in vivo*. 2017. 87f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, 2017.

PINHEIRO, J.P.S., ASSIS, C.B., MUÑOZ-PEÑUELA, M., JÚNIOR, F.B., CORREIA, T.G., MOREIRA, R.G. 2019. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). *Chemosphere*. 220, 266-274.

PORTO-FORESTI, F., CASTILHO-ALMEIDA, R.B., FORESTI, F. 2005. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), in: Baldisseroto, B., Gomes, L. C. (Eds.), Espécies nativas para piscicultura no Brasil - Editora UFSM, Santa Maria, pp. 470.

QUADRA, G.R., SOUZA, H.O., COSTA, R.S., FERNADEZ, M.A.S., 2017. Do Pharmaceuticals Reach and Affect the Aquatic Ecosystems in Brazil? A Critical Review of Current Studies in a Developing Country. *Environ Sci Pollut Res*. 24, 1200–1218.

RAND, G.M., WELLS, P.G. & MC CARTY, L.S. 1995. Introduction to aquatic toxicology, in: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate And Risk Assessment*. Second Edition - Taylor & Francis, Washington DC, pp.3-67.

RICHARDSON, S.D., PLEWA, M.J., WAGNER, E.D., SCHOENY, R., DEMARINI, D.M., 2007. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat. Res*. 636, 178–242.

SCHULZ, R.W., NÓBREGA, R.H. 2011. Regulation of Spermatogenesis, in: Farrell A.P., (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* - Academic Press, San Diego, pp. 627–634.

SANTOS, L.H., ARAÚJO, A.N., FACHINI, A, PENA, A, DELERUE-MATOS, C., MONTENEGRO, M.C. 2010. Ecotoxicological Aspects Related to the Presence of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. *J. Hazard. Mater.*,175, 45-95.

UCHIDA, M., YAMASHITA, T., KITANO, T., IGUCHI, T. 2004. An aromatase inhibitor or highwater temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450

aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal, *Comp. Biochem. Physiol.* 137, 11–20.

VILLENEUVE, D.L., BLAKE, L.S., BRODIN, J.D., GREENE, K.J., KNOEBL, I., MIRACLE, A.L., MARTINOVIC, D., ANKLEY, G.T. 2007. Transcription of Key Genes Regulating Gonadal Steroidogenesis in Control and Ketoconazole- or Vinclozolin-Exposed Fathead Minnows. *Toxicol. Sci.* 98(2), 395–407.

WEBER, A.A., MOREIRA, D. P., MELO, R.M.C., RIBEIRO, Y.M., BAZZOLI, N., RIZZO, E. 2019. Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 279, 99–108.

WANG, F., LIU, F., CHEN, W., XU, R., WANG, W. 2018. Effects of triclosan (TCS) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary- gonad axis of juvenile male Yellow River carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere.* 193, 695-701.

ZAGATTO, P.A. 2006. Ecotoxicologia, in: Zagatto, P.A., Bertoletti, E. (Eds.), *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. RiMa (Eds.), *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações- RiMa*, São Carlos, pp. 1-2.

Legendas das Figuras

Figura 1: Desenho experimental da placa de cultura utilizada nos explantes de hipófise. Placa de cultura de 96 wells com 7 poços preenchidos em rosa, que representam que em cada poço, uma hipófise foi mantida por 12 horas em 200 uL de meio L-15. Cada linha representa um tratamento. A- Tratamento negativo (Somente L-15). B- Tratamento positivo L-15 + GnRH. C a G- Diferentes concentrações do fármaco testado em meio L-15 contendo GnRH. Esse esquema foi utilizado nos 3 experimentos (diclofenaco, ibuprofeno e mistura).

Figura 2: Sistema in vitro de explante testículo. 1-testículo; 2-membrana de nitrocelulose; 3- cilindro de agarose; 4-meio de cultura (1 ml). Modificado de Leal et al., (2009).

Figura 3: Desenho experimental da placa de cultura utilizada no primeiro explante de testículo. Placa de cultura de 24 wells com 6 poços preenchidos em rosa, que representam que em cada poço continha 1 mL de meio L-15, cilindro representando o bloco de agarose com fragmento de testículo em cada um, mantidos por 12 horas em incubadora a 26 °C. Cada linha representa um tratamento. A- Tratamento negativo (Somente L-15). B a D- Diferentes concentrações de hCG a ser testado em meio L-15.

Figura 4: Desenho experimental de uma das placas de cultura utilizadas no segundo explante de testículo. Placa de cultura de 96 wells, em cada poço continha 200 uL de meio L-15 com um fragmento de testículo em cada um, mantidos por 12 horas em em incubadora a 26 °C. Cada linha representa um tratamento. A- Tratamento negativo (Somente L-15). B a G- Diferentes concentrações de hCG a ser testado em meio L-15.

Figura 5: Desenho experimental de uma das placas de cultura utilizadas no terceiro explante de testículo. Placa de cultura de 96 wells, em cada poço continha 200 uL de meio L-15 com um fragmento de testículo em cada um, mantidos por 12 horas em em incubadora a 26 °C. Cada linha representa um tratamento. A- Tratamento negativo (Somente L-15). B a F- Diferentes concentrações de hCG a ser testado em meio L-15.

Figura 6: Delineamento experimental de uma das placas de cultura utilizadas no explante de testículo sob efeito de anti-inflamatórios. Placa de cultura de 96 wells, em cada poço continha 200 uL de meio L-15 com um fragmento de testículo em cada um, mantidos por 12 horas em em incubadora a 26 °C. Cada linha representa um tratamento. A- Tratamento negativo (Somente L-15). B- Tratamento positivo L-15 + 10 IU/mL de hCG. C a G- Diferentes concentrações do fármaco a ser testado em meio L-15 contendo hCG. Esse esquema foi utilizado nos 2 experimentos (diclofenaco e ibuprofeno).

Figura 7: Níveis relativos da expressão gênica de *fshb* e *lhb* na hipófise de machos do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 12 horas de exposição ao diclofenaco em diferentes concentrações. Barras representam média ± erro padrão dos níveis relativos de RNAm normalizados com fator de alongação 1 alpha (*elfa1*) e expressos como “*fold induction*” em relação ao grupo controle. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 8: Níveis relativos da expressão gênica de *fshb* e *lhb* na hipófise de machos do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 12 horas de exposição ao ibuprofeno em diferentes concentrações. Barras representam média ± erro padrão dos níveis relativos de RNAm normalizados com fator de alongação 1 alpha (*elfa1*) e expressos como “*fold induction*” em relação ao grupo controle. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 9: Níveis relativos da expressão gênica de *fshb* e *lhb* na hipófise de machos do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 12 horas de exposição a mistura (MIST.), na mesma proporção de diclofenaco e ibuprofeno em diferentes concentrações. Barras representam média \pm erro padrão dos níveis relativos de RNAm normalizados com fator de alongação 1 alpha (*elfa1*) e expressos como “*fold induction*” em relação ao grupo controle. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 10: Dados da concentração de 11 cetotestosterona e testosterona (média \pm EPM) liberados no meio de cultura por fragmentos de testículos de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 12 horas de exposição a diferentes concentrações de hCG no experimento 1 de padronização. Letras iguais indicam que não houve diferenças estatísticas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Figura 11: Concentração de 11 cetotestosterona, testosterona e 17β -estradiol (média \pm EPM) no meio de cultura, liberado por fragmentos de testículos de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 12 horas de exposição a diferentes concentrações de hCG no experimento 2 de padronização. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Figura 12: Concentração de 11 cetotestosterona, testosterona e 17β -estradiol (média \pm EPM) no meio de cultura, liberado por fragmentos de testículos de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 12 horas de exposição a diferentes concentrações de hCG no experimento 3 de padronização. Letras iguais indicam que não houve diferenças estatísticas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Figura 13: Concentração de 11 cetotestosterona, testosterona e 17β -estradiol (média \pm EPM) no meio de cultura, liberado por fragmentos de testículos de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 12 horas de exposição ao diclofenaco em diferentes concentrações. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Figura 14: Concentração de 11 cetotestosterona, testosterona e 17 β -estradiol (média \pm EPM) no meio de cultura, liberado por fragmentos de testículos de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* após 12 horas de exposição ao ibuprofeno em diferentes concentrações. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Figura 15: Fotomicrografia de secção histológica do testículo de *Astyanax altiparanae*. A: Secção histológica de testículo na fase apto à reprodução com epitélio germinativo contínuo (EGC) contendo cistos de espermatócitos (Sc), espermátides (St) e epitélio germinativo descontínuo (EGD), com muitos espermatozoides na luz testicular (Sz). Barras: A: 500 μ m.

Figura 16: Fotomicrografia de secção histológica do testículo de *Astyanax altiparanae*. A: Secção histológica de testículo na fase apto à reprodução com epitélio germinativo descontínuo (EGD) com muitos espermatozoides na luz testicular (Sz). Barras: A: 100 μ m.

Figuras e Tabelas

Figura 1

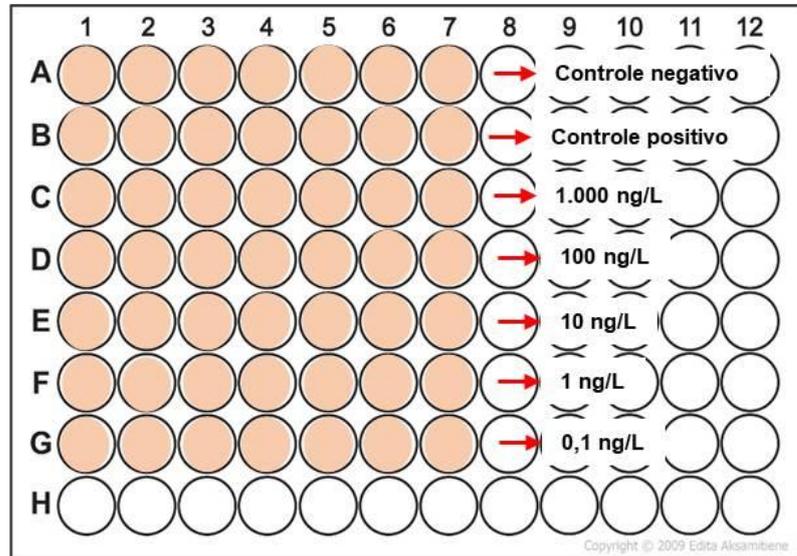


Figura 2

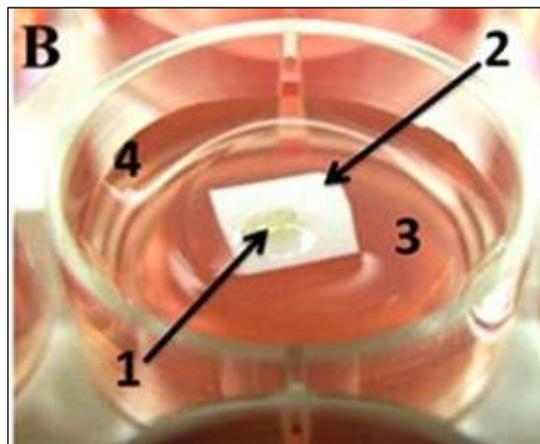


Figura 3

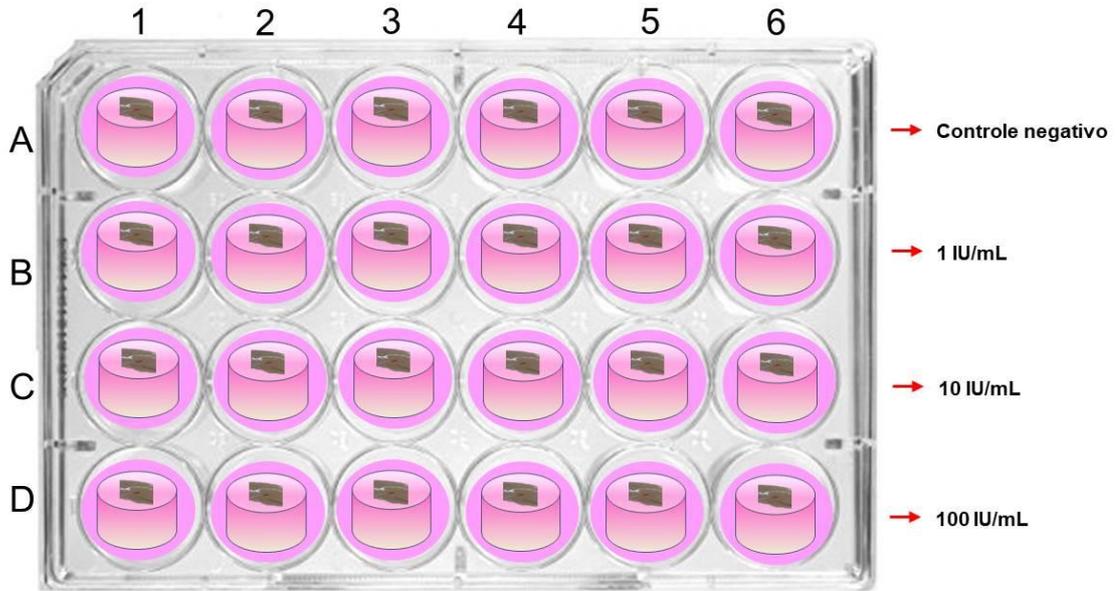


Figura 4

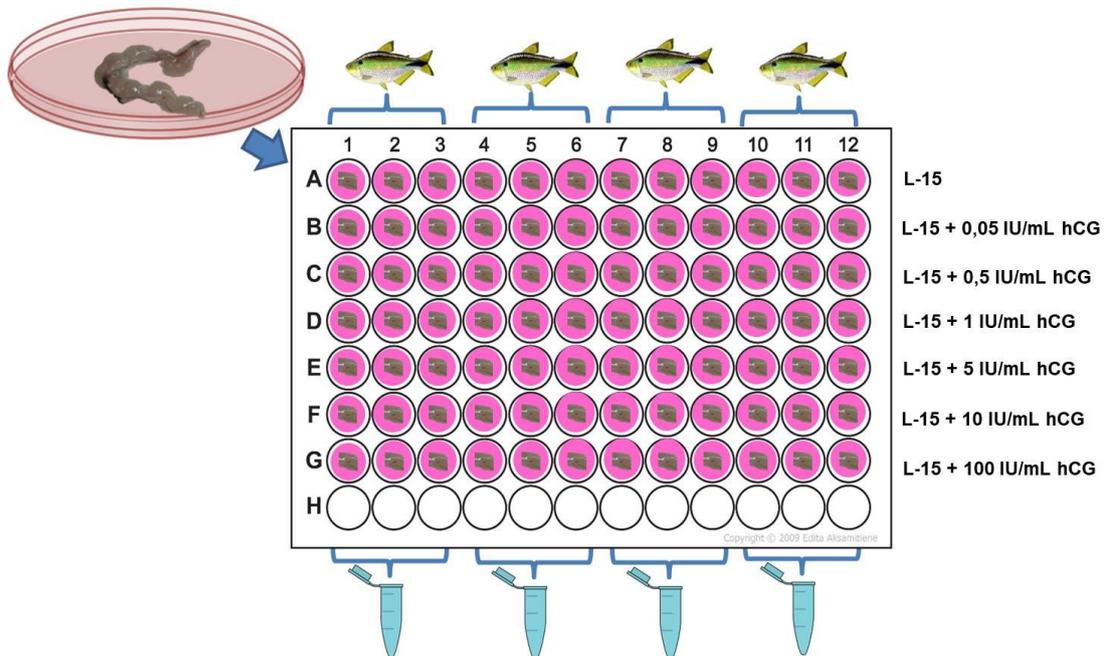


Figura 5

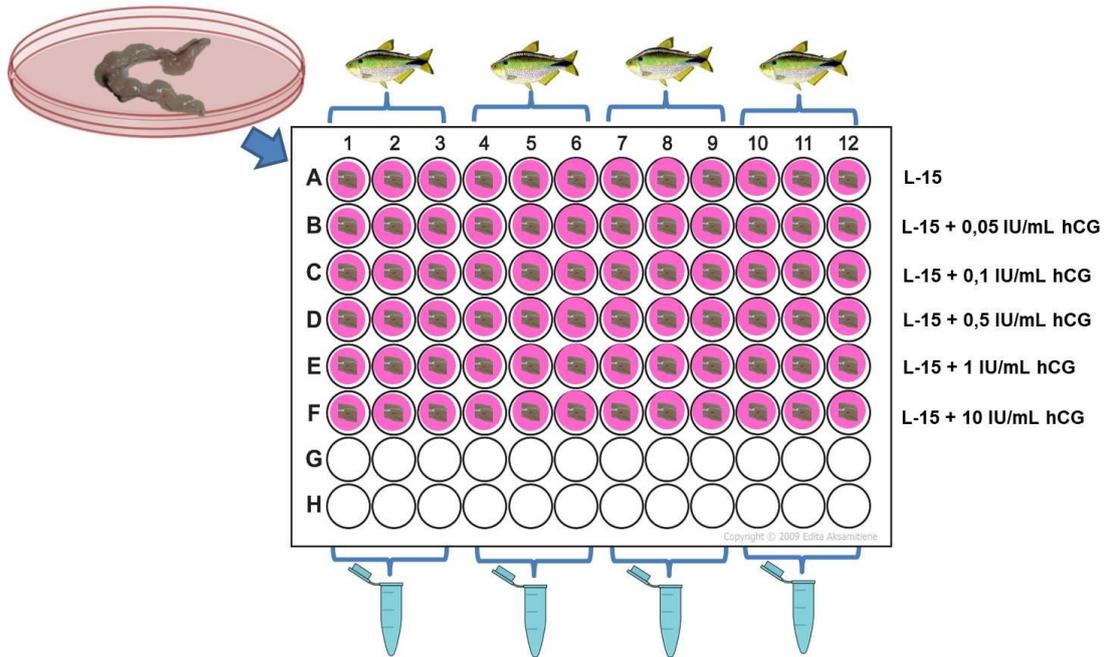


Figura 6

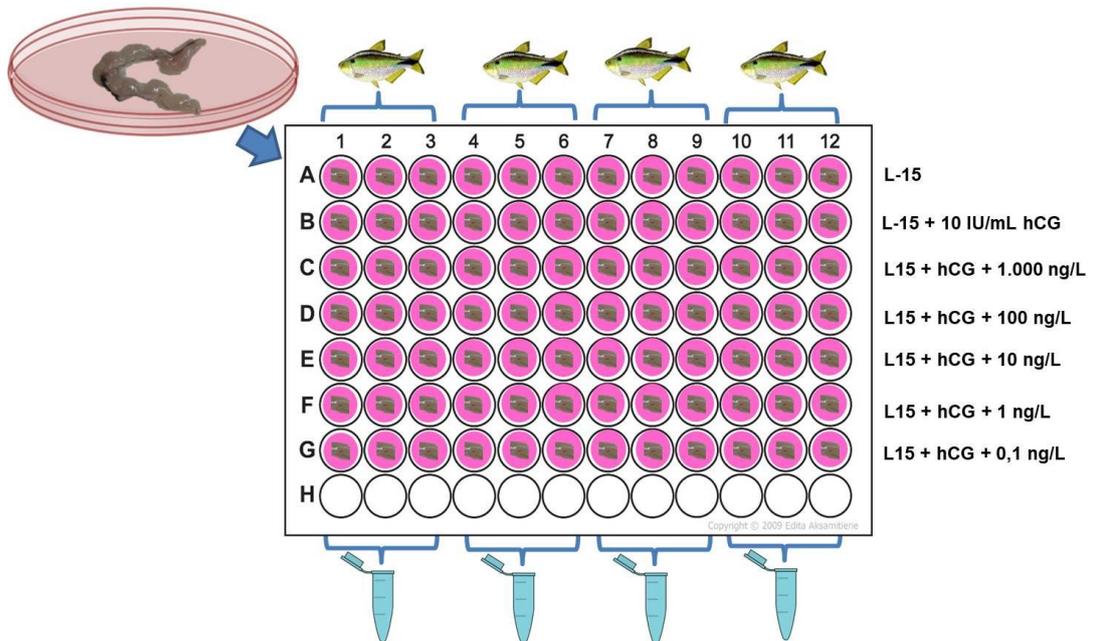


Figura 7

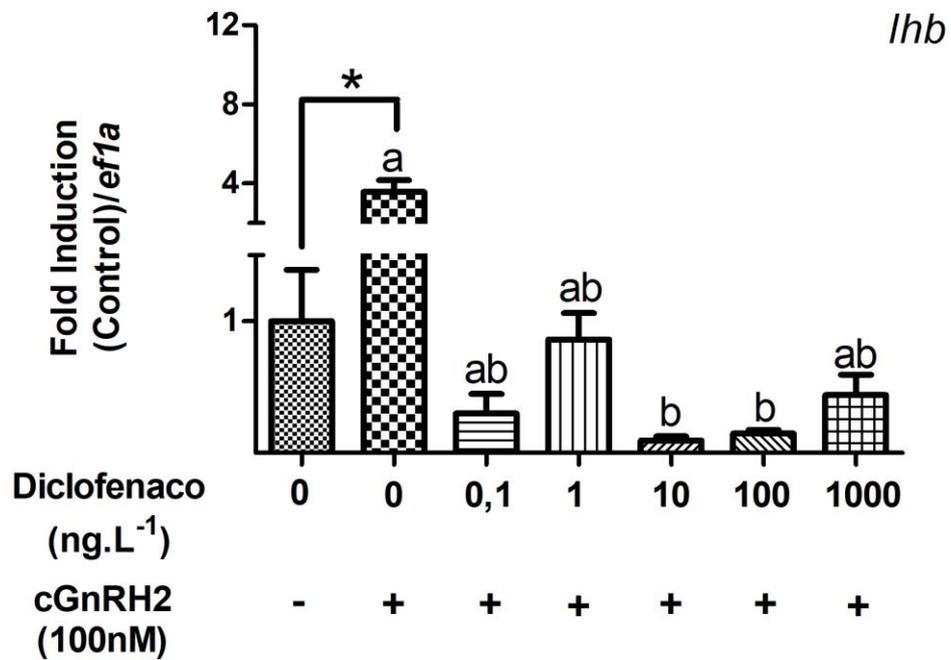
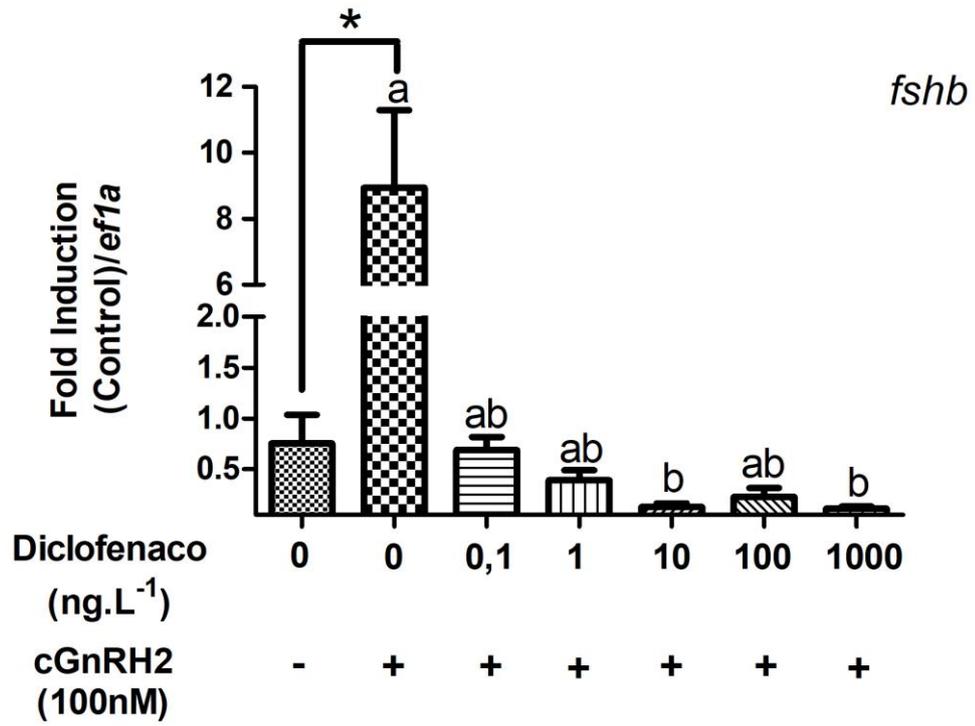


Figura 8

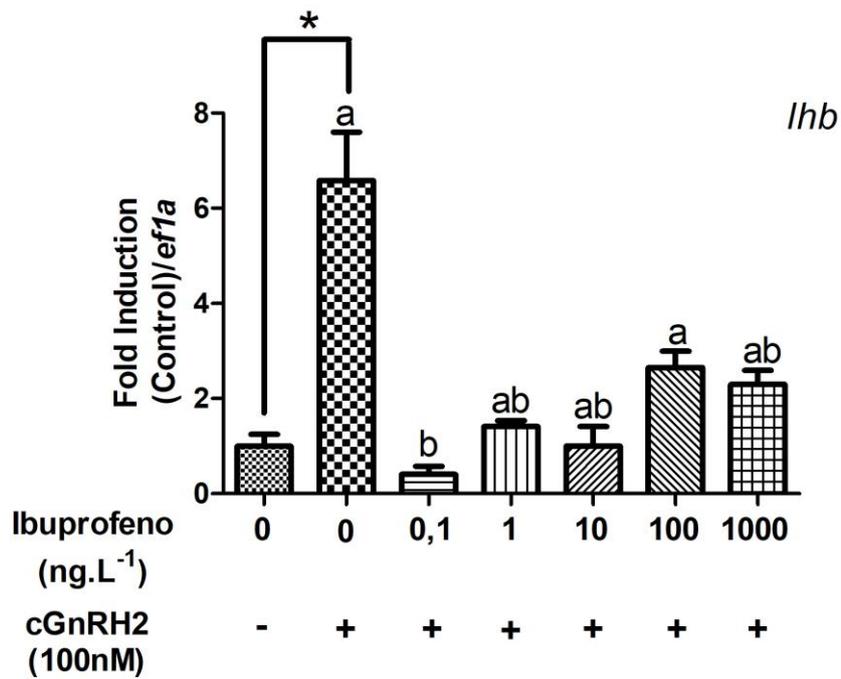
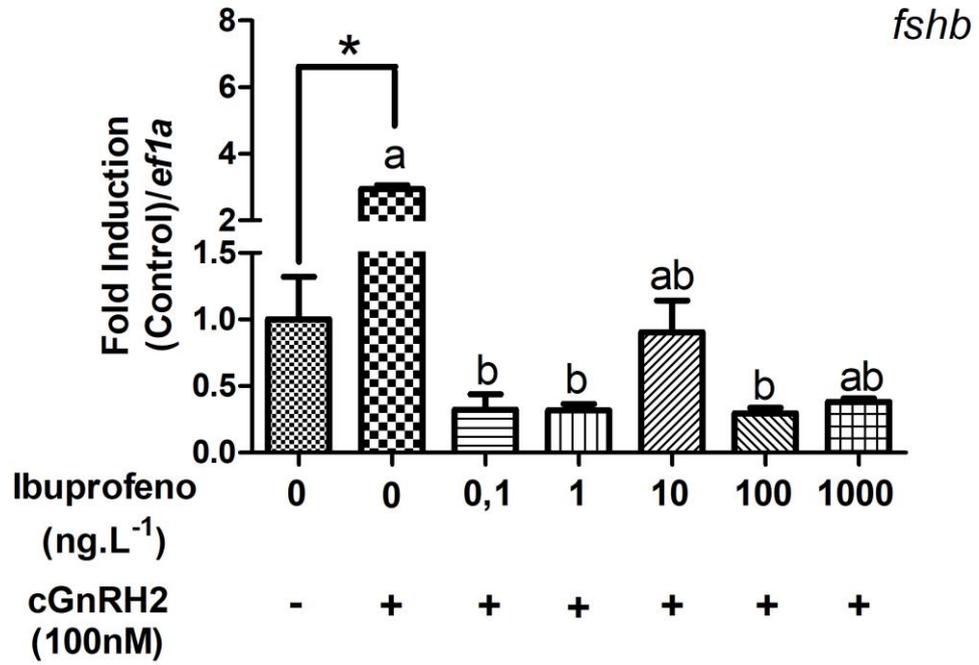


Figura 9

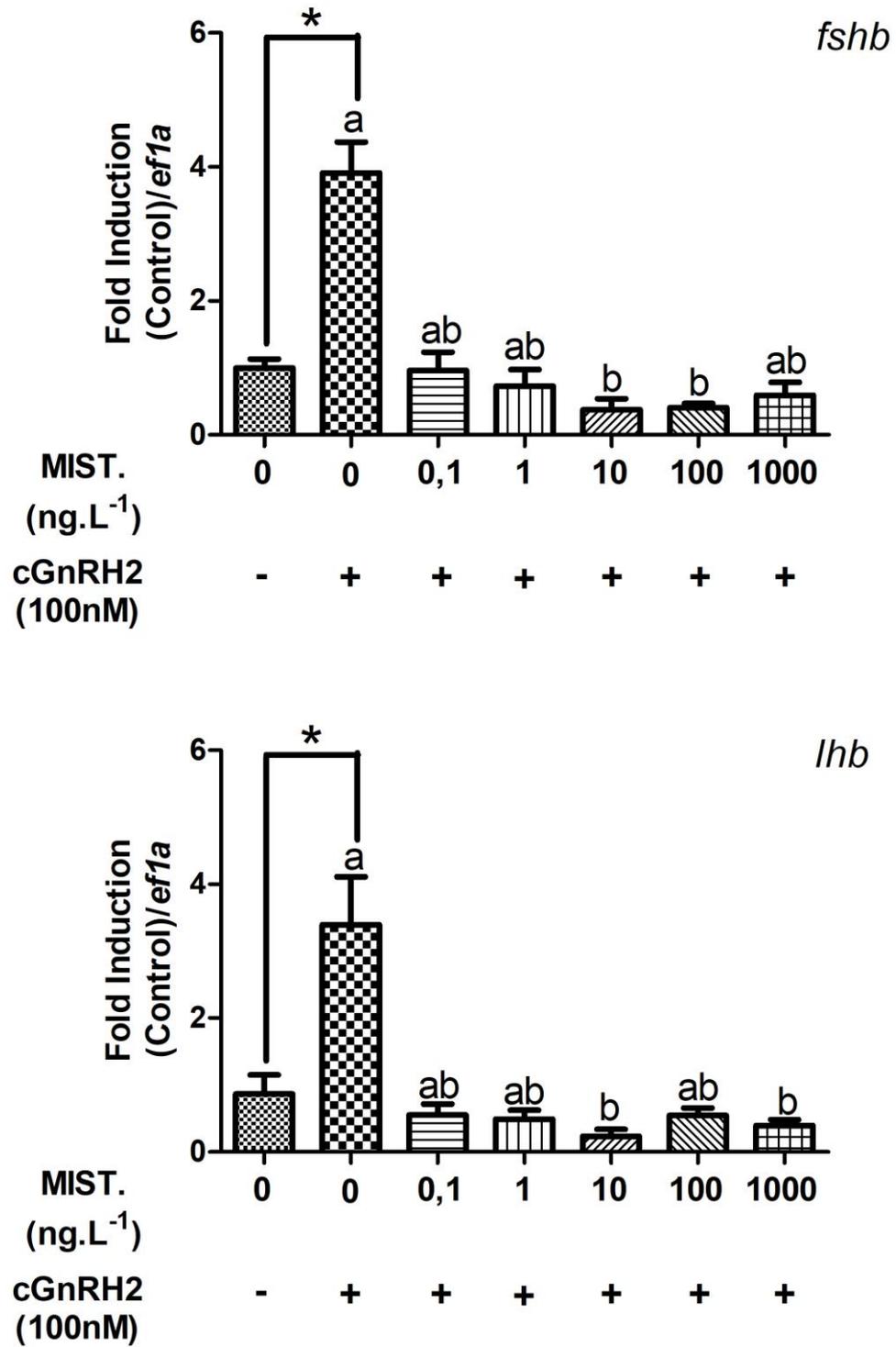


Figura 10

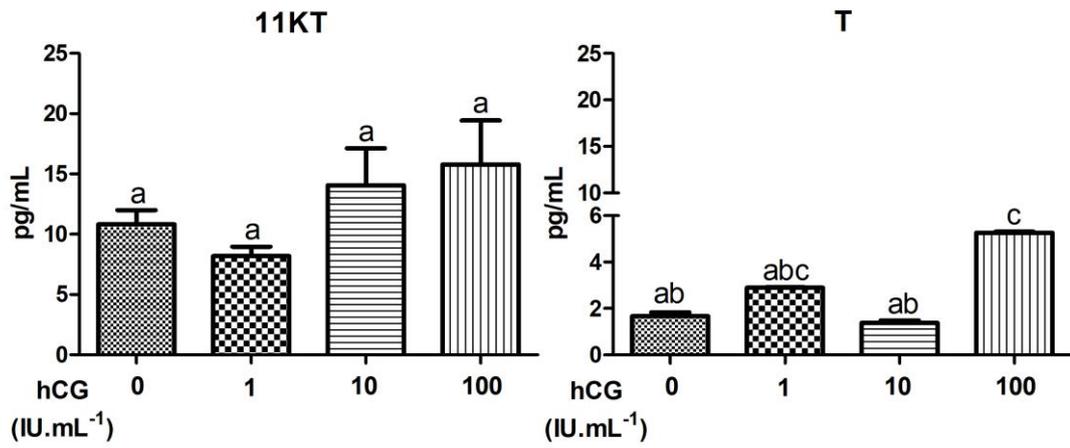


Figura 11

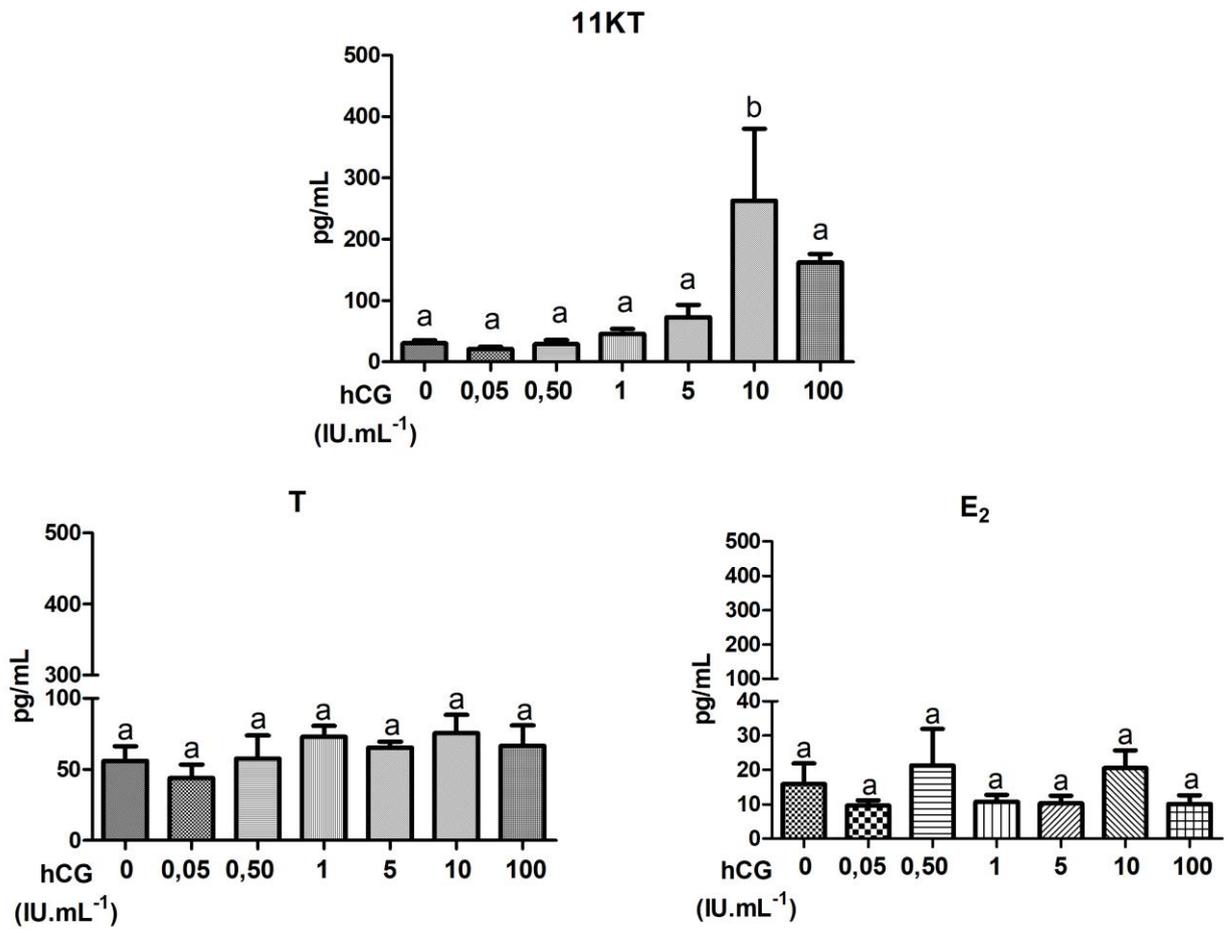


Figura 12

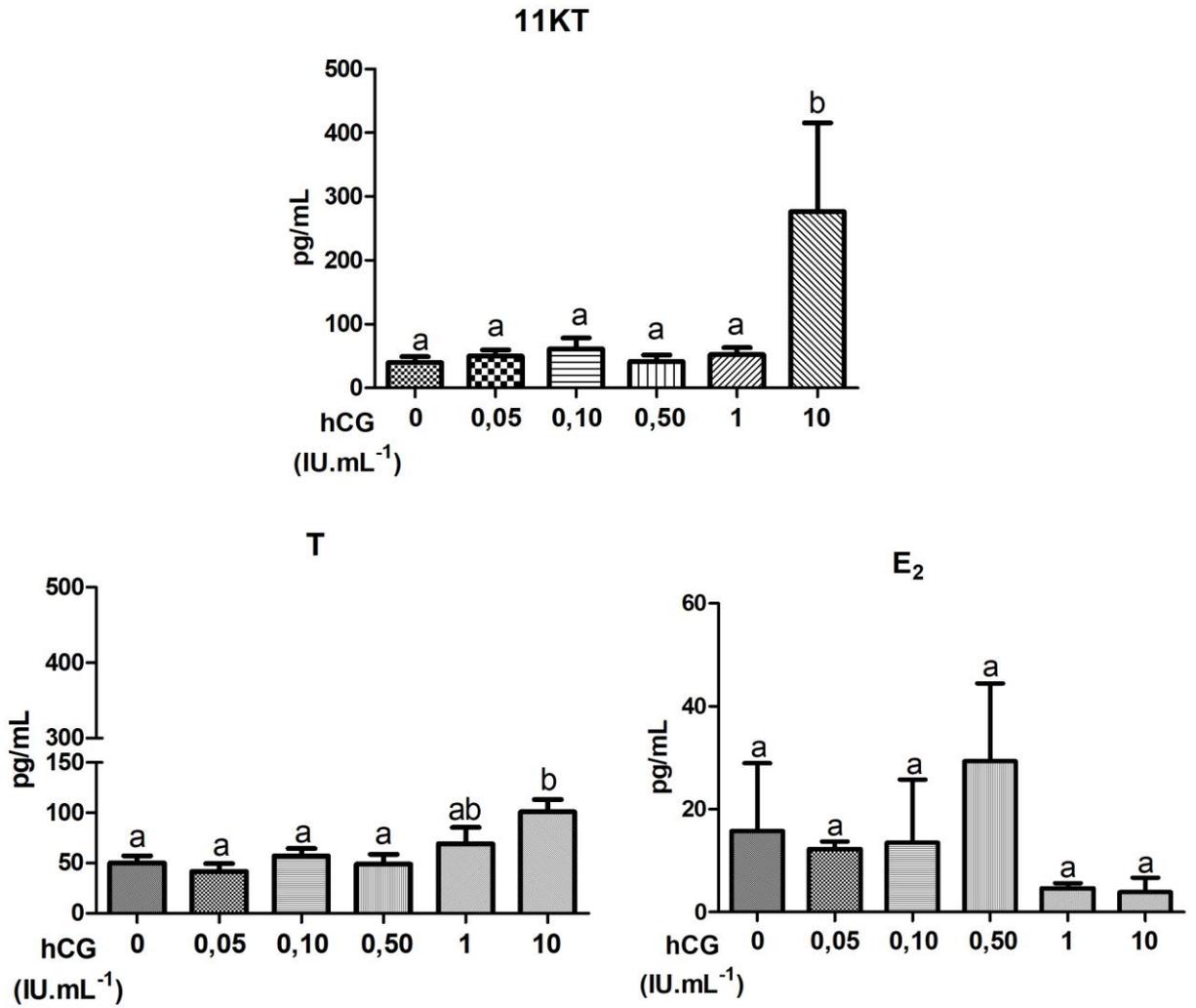


Figura 13

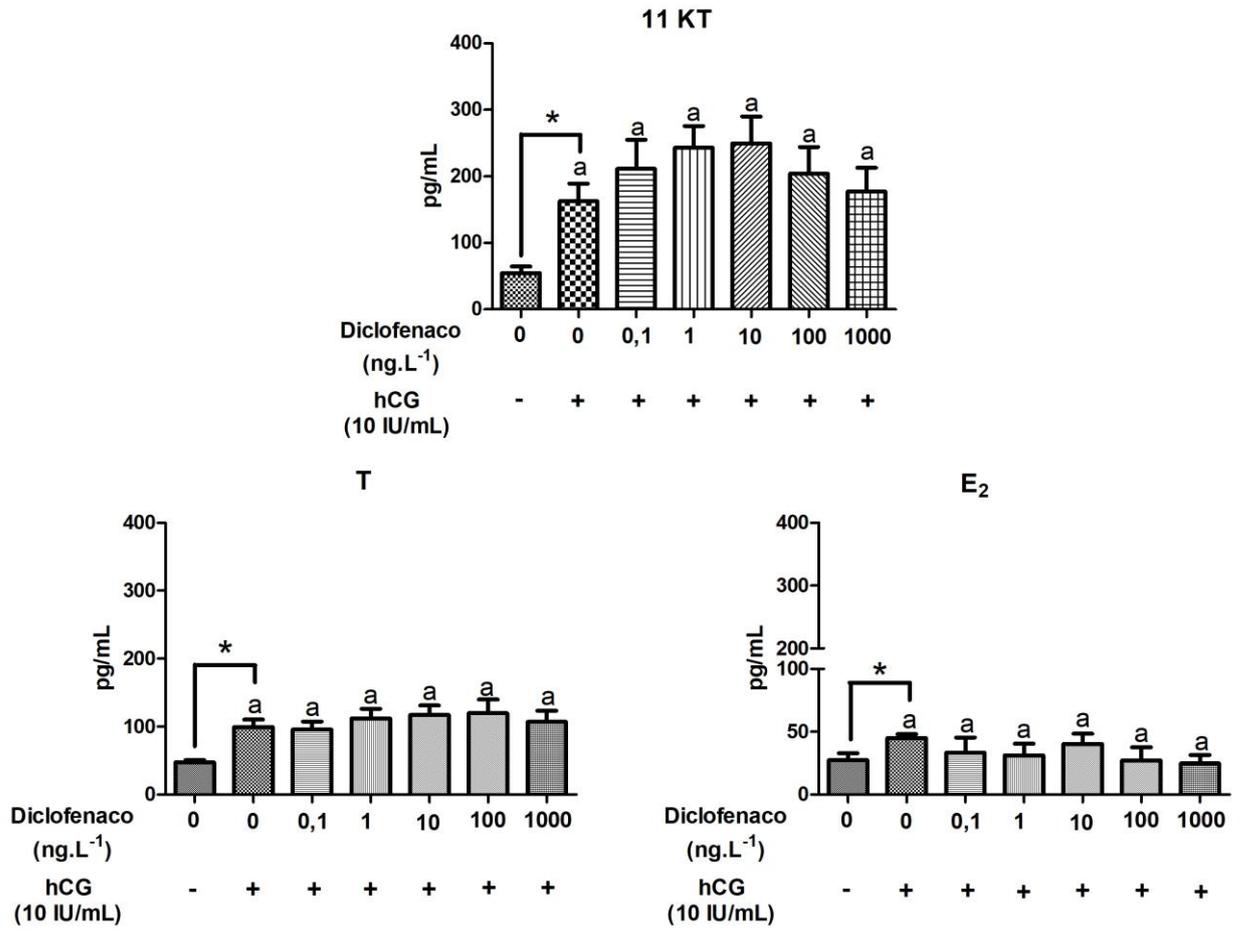


Figura 14

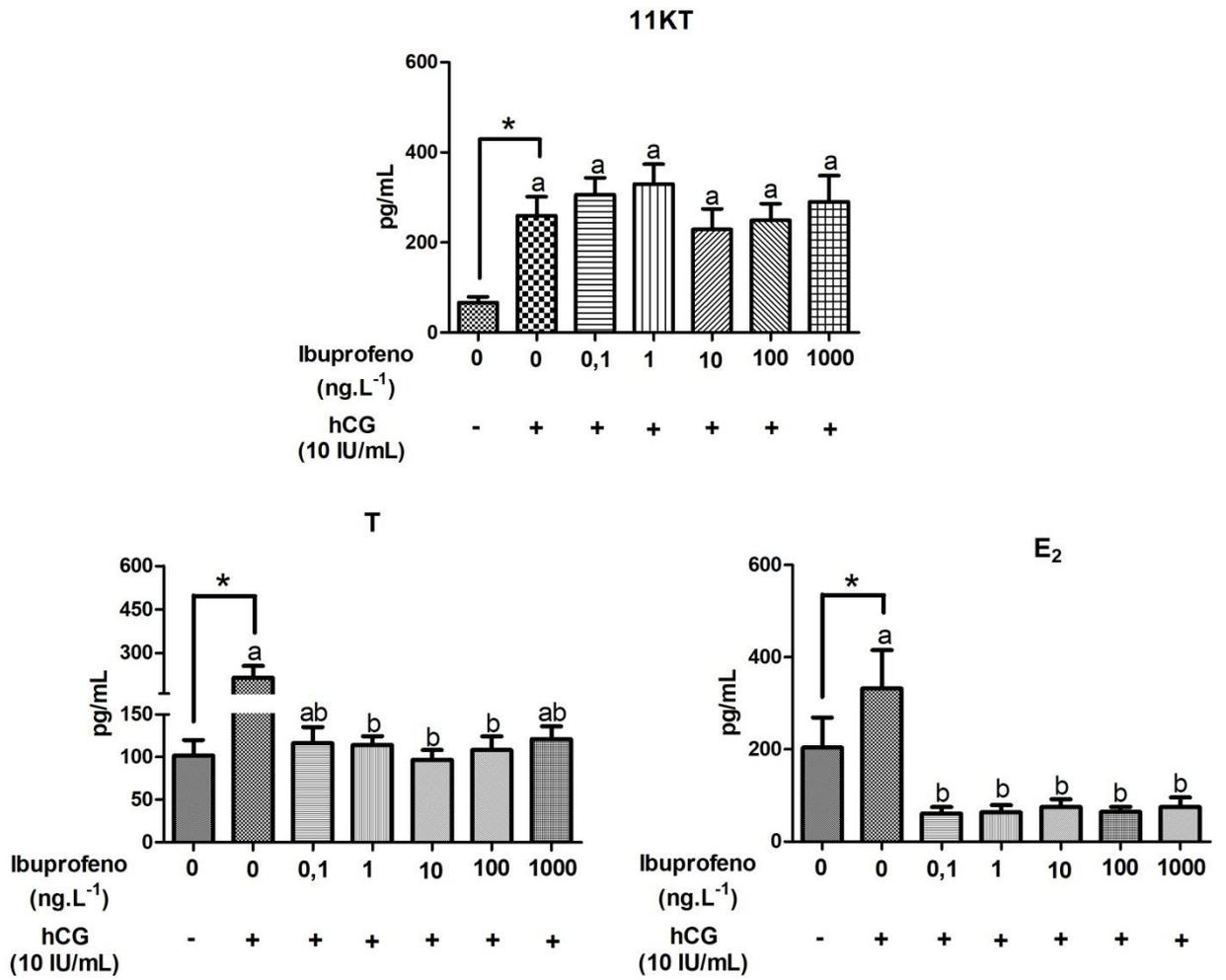


Figura 15

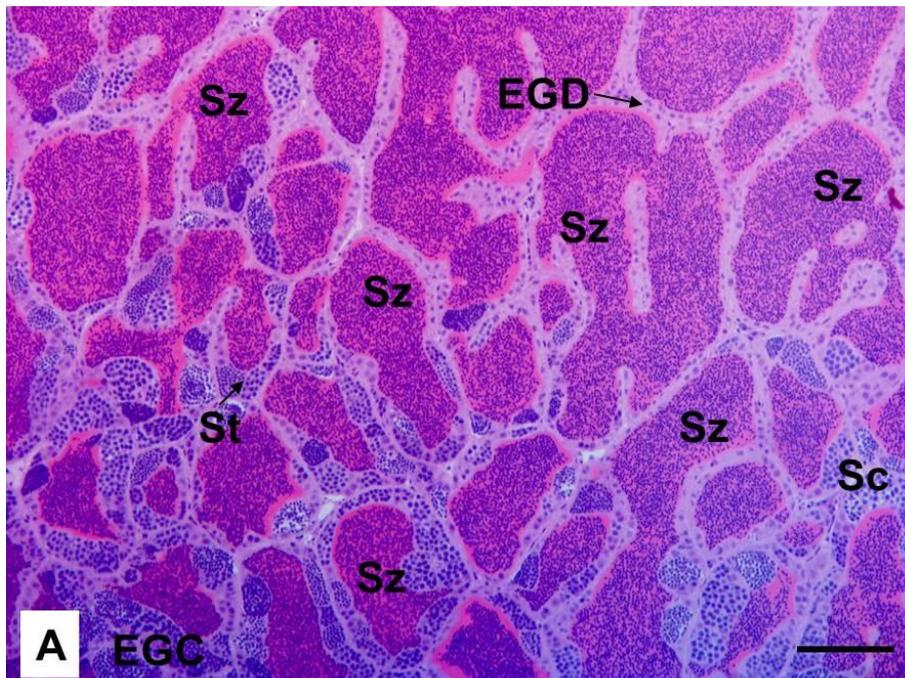


Figura 16

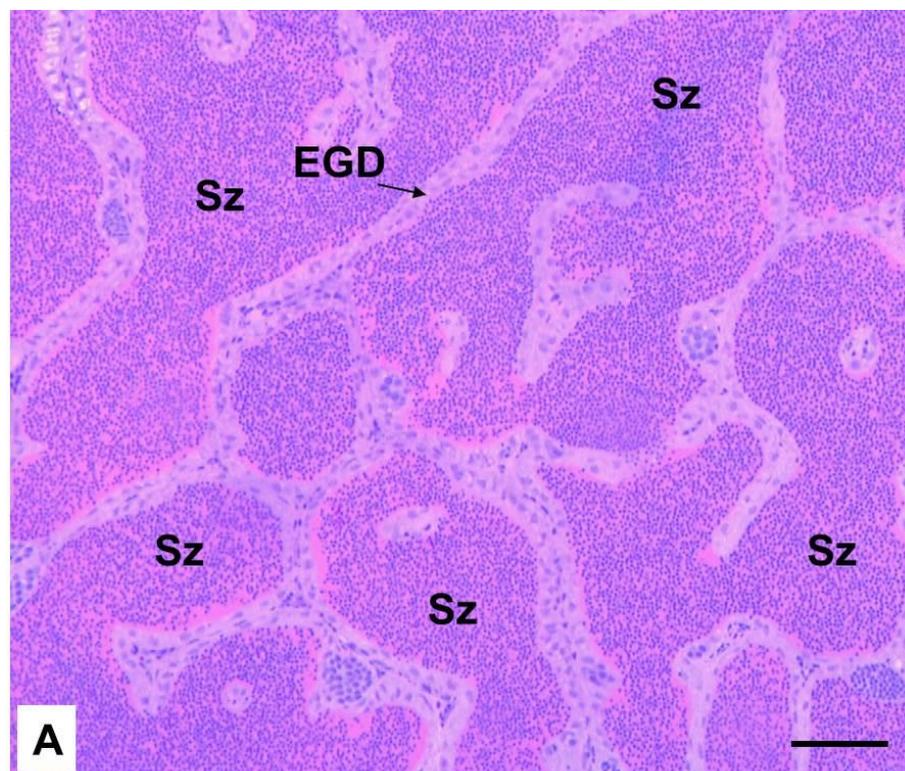


Tabela 1: Primers validados e utilizados nos ensaios de qPCR.

GenBank target accession	Primer	Sequence 5'→3'
KM210283	<i>elfa1F_4501</i>	CACTGGTACCTCACAGGCTGACT
	<i>elfa1R_4503</i>	CCAGCCTCAAACCTCACCAACA
KJ544557	<i>fshb F3_4525</i>	GTCCTGATGATTCTGCTGCT
	<i>fshb R3_4526</i>	GCATTCCTCGCTCTCCAC
KJ544556	<i>lhb F_4419</i>	TGCCCAAATGCCTAGTGTTTC
	<i>lhb R_4420</i>	TCTTGTACACCGGATCCTTGGT

DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, avaliou-se a expressão das gonadotropinas (*fshb* e *lhb*) de lambaris por meio de explantes de hipófise em diferentes concentrações de GnRH, GnIH e sob ação dos anti-inflamatórios não esteroidais – ibuprofeno e diclofenaco, além da avaliação da liberação dos esteroides gonadais em explantes de testículos.

Para tanto, o primeiro passo foi determinar o perfil de expressão das gonadotropinas em diferentes tempos de cultura, no intuito de avaliar a viabilidade da técnica para essa espécie. Após a padronização e validação dos dados, foi possível conduzir os experimentos.

As hipófises de lambaris machos cultivadas com 10 nM GnRH2 não provocaram alteração na expressão gênica do *fshb* e nem do *lhb*. Em conjunto, estes dados indicam que doses pequenas (como a de 10 nM) de GnRH, são insuficientes para estimular a expressão das gonadotropinas em hipófises de lambaris *in vitro*, porém, em concentrações maiores, o GnRH estimula as células gonadotrópicas da hipófise a aumentarem essa expressão e, muito provavelmente, atue estimulando a produção e secreção das gonadotropinas. Culturas de hipófises de salmão coho tratadas com 10 nM GnRH mostraram um aumento significativo nos níveis de RNAm de *fshb* em machos e em fêmeas (Dickey e Swanson, 2000).

De uma forma geral, conclui-se que doses pequenas de GnRH são insuficientes para estimular a expressão de *fshb* e *lhb*, porém, em concentrações maiores, o GnRH atua estimulando as células gonadotrópicas. Para o GnIH, por sua vez, não foi possível determinar com base na expressão de *fshb* e *lhb*, a sua capacidade inibitória ou estimulatória sobre esta via.

Com base em evidências em mamíferos e em aves, o GnIH têm demonstrado ações inibitórias na reprodução, manifestando-se por meio da modulação da liberação neuronal de GnRH, da liberação de gonadotropinas induzida por GnRH e da inibição direta/indireta da expressão gênica das gonadotropinas (Smith *et al.*, 2010, Ubuka *et al.*, 2012). Entretanto, estudos recentes vêm mostrando resultados diferentes do reportado em aves e em

mamíferos. Qi *et al.* (2013), conduziram experimentos com culturas primárias de células hipofisárias de goldfish (*Carassius auratus*) tratadas com GnIH-II; GnIH-III; GnIH-II +LHRH-A; e GnIH-III+LHRH-A, sendo que LHRH-A serviu como controle positivo e foi projetado para interagir com o receptor GnRH e modificar a liberação das gonadotropinas.

Os resultados mostraram que o GnIH-II e o GnIH-III não tiveram efeito sobre os níveis de RNAm de *fshb* e *lhb*. Porém, o GnIH-III mostrou um efeito inibitório sobre os níveis de expressão gênica do *fshb* quando o GnRH estava presente, sendo que não apresentou efeito nos níveis de *lhb*. O fato de diferentes concentrações de GnIH não interferirem sobre a expressão gênica do *fshb* e *lhb* no lambari no presente estudo, possivelmente, se deve ao fato da ausência de elementos estimuladores, como GnRH. Como relatado acima, os efeitos do GnIH, sejam eles estimulatórios ou inibitórios, só ocorreram na presença do GnRH. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que os papéis do GnRH e do GnIH são extremamente variados e podem ser dependentes da espécie, do estágio reprodutivo dos animais e da via de administração dos hormônios.

Quando alguns fatores alteram o funcionamento do eixo reprodutivo, os efeitos podem ser diretos nos órgãos alvo, prejudicando a síntese e liberação hormonal dos tecidos envolvidos (encéfalo-hipófise-gônadas) e são considerados desreguladores endócrinos (Nishi *et al.*, 2002).

A realização de estudos que visam compreender como é afetado o eixo reprodutivo, em relação à via hipófise-testículo e como os desreguladores endócrinos afetam na expressão gênica dos mRNAs das gonadotropinas e ainda na síntese e liberação dos hormônios esteroides, agregam à ciência o conhecimento do efeito desses compostos que já estão presentes nos corpos d'água de todo país.

Desta forma, após avaliarmos os efeitos do ibuprofeno e diclofenaco na síntese dos hormônios gonadotrópicos e esteroides, observamos que os anti-inflamatórios apresentaram efeitos na expressão gênica de gonadotropinas hipofisárias, como o ibuprofeno também teve efeito na liberação de esteroides por fragmentos de testículos *in vitro*.

Observa-se que, nas diferentes espécies, o diclofenaco e o ibuprofeno podem ter efeitos diferentes tanto em dosagens diversas, como dependendo também do tipo do ensaio. Nos ensaios *in vivo* já foi reportado na literatura efeito nas gonadotropinas independente da concentração em ensaio subcrônico na espécie *Danio rerio* (Ji et al., 2013).

Poucas espécies nativas de interesse comercial, foram estudadas sob aspecto da influência dos fármacos sob diversas vias metabólicas, destacando os trabalhos com jundiá (Guiloski *et al.*, 2017) e com lambari (Godoi *et al.*, 2020). Nesses trabalhos, diversos aspectos foram analisados, em relação ao jundiá, o objetivo foi analisar os parâmetros de estresse oxidativo e biotransformação no fígado de animais após exposição ao diclofenaco. A exposição a concentrações ambientais de diclofenaco em um ensaio crônico afetou defesas antioxidantes hepáticas e gonadais de *Rhamdia quelen* (Guiloski *et al.*, 2017).

Em relação ao eixo reprodutivo, a espécie elencada para esse trabalho, *A. altiparanae*, em um trabalho anterior do nosso grupo, apresentou redução significativa em relação aos níveis de T e ainda redução da concentração plasmática de E2 (Godoi *et al.*, 2020). Com isso, temos que, de maneira geral, é muito importante escolher o tipo de ensaio previamente para poder elucidar qual melhor tempo e dosagem seja *in vitro* ou *in vivo*.

Nesse trabalho concluímos que, o ensaio *in vitro* serve como meio de comparação para entraves que podem ser encontrados na reprodução dessa espécie e os resultados obtidos podem elucidar explicações para possíveis falhas na regulação do eixo reprodutivo.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ABDALLA, R.P., KIDA, B.M.S., PINHEIRO, J.P.S., OLIVEIRA, L.F., MARTINEZ, C.B.F., MOREIRA, R.G. 2019. Exposure to aluminum, aluminum+manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 215, 33–40.

ADOLFI, M.C., CARREIRA, A.C.O., JESUS, L.W.O., BOGERD, J., FUNES, R.M., SCHARTL, M., SOGAYAR, M.C., BORELLA, M.I., 2015. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13, 1-15.

BOSMA, P.T., REBERS, F.E.M., DIJK, W. V., WILLEMS, P.H.G.M., GOOS, H.J. TH., SCHULZ, R.W. 2000. Inhibitory and stimulatory interactions between endogenous gonadotropin-releasing hormones in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol. Reprod.* 62, 731–738.

BRAMBILA-SOUZA, G., MYLONAS, C.C., MELLO, P.H., KURADOMI, R.Y., BATLOUNI, S.R., TOLUSSI, C.E., MOREIRA, R.G. 2019. Thermal manipulation and GnRH α therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 279, 120-128.

CAMARGO, M.P., CASSEL, M., JESUS, L.W.O., NÓBREGA, R.H., BORELLA, M.I. Characterization of undifferentiated spermatogonia and the spermatogonial niche in the lambari fish *Astyanax altiparanae*. *Theriogenology.* 96, 97-102.

CASSEL, M., CHEHADE, C., BRANCO, G.S., CANEPPELE, D., ROMAGOSA, E., BORELLA, M.I. 2017. Ovarian development and reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over a year and its application in fish farming. *Theriogenology.* 98, 1-15.

CHEHADE, C., CASSEL, M., BORELLA, M.I., 2015. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. *Neotrop. Ichthyol.* 13, 205–212.

COSTA, F.G., ADOLFIB, M.C., GOMES, C.C., JESUS, L.W.O., BATLOUNI, S.R., BORELLA, M.I. 2014. Testes of *Astyanax altiparanae*: The Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis. *Micron*. 61, 20-27.

DICKEY, J.T., SWANSON, P. 2000. Effects of Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone on Follicle Stimulating Hormone Secretion and Subunit Gene Expression in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol*, 118, 436–449.

DI YORIO, M.P., PÉREZ SIRKIN, D.I., DELGADIN, T.H., SHIMIZU, A., TSUTSUI, K., SOMOZA, G.M., VISSO, P.G. 2016. Gonadotropin-inhibitory hormone in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: structure, brain distribution and differential effects on the secretion of gonadotropins and growth hormone. *J. Neuroendocrinol*. 28, 5.

FERNANDES, D., SCHNELL, S., PORTE, C. 2011. Can pharmaceuticals interfere with the synthesis of active androgens in male fish? An *in vitro* study. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2250–2253.

GARCIA-HERNANDEZ, M.P., GARCIA-AYALA, A., ZANDBERGEN, M.A., AGULLEIRO, B. 2002. Investigation into the duality of gonadotropic cells of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Gen. Comp. Endocrinol*. 128, 25–35.

GARUTTI, V., BRITSKI, H.A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) da bacia do alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações Museu de Ciências e Tecnologia PUC Série Zoologia*. 13, 65-88.

GODOI, F.G.A., MUÑOZ-PEÑUELA, M., GOMES, A.D.O., TOLUSSI, C.E., BRAMBILA-SOUZA, G., BRANCO, G.S., LO NOSTRO, F.L., MOREIRA, R.G. Endocrine disruptive action of diclofenac and caffeine on *Astyanax altiparanae* males (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comp. Biochem. Physiol. C*. submetido.

GOMES, C.C., COSTA, F.G., BORELLA, M.I. 2013. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). *Micron*. 52-53, 33-38.

GUILOSKI, I.C., PIANCINI, L.D.S., DAGOSTIM, A.C., CALADO, S.L.M., FÁVARO, L.F., BOSCHENA, S.L., CESTARI, M.M., CUNHA, C., ASSIS. H.C.S., 2017.

Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 291-300.

HAN, S., CHOI, K., KIM, J., JI, K., KIM, S., AHN, B., YUN, J., CHOI, K., KHIM, J.S., ZHANG, X., GIESY, J.P. 2010. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat.Toxicol.* 98, 256–264.

HANCHATE, N.K. 2011. Role of Sema3A/Neuropilin1 signaling in GnRH system development and study of the involvement of NO-synthesizing neurons in the kisspeptin-dependent preovulatory activation of adult GnRH neurons. Human health and pathology. Université du Droit et de la Santé - Lille II. English. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/278642910_Role_of_Sema3ANeuropilin_1_signaling_in_GnRH_system_development_and_study_of_the_involvement_of_NOsynthesizing_neurons_in_the_kisspeptindependent_preovulatory_activation_of_adult_GnRH_neurons. 198f.

HEINDEL, J.J., ZOELLER, R.T., JOBLING, S., IGUCHI, T., VANDENBERG, L., WOODRUF, T.J. 2013. What is endocrine disruption all about? In: Bergman, A., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., Zoeller, R.T. (eds.). State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012 - United Nations Environment Programme and the World Health Organization, 296p.

JESUS, L.W.O., BOGERD, J., VIECELI, F.M., BRANCO, G.S., CAMARGO, M.P., CASSEL, M., MOREIRA, R.G., YAN, C.Y.I., BORELLA, M.I. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: Molecular characterization, spatiotemporal expression and their possible role on female reproductive dysfunction in captivity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 246, 150-163.

KAH, O., LETHIMONIER, C., SOMOZA, G., GUILGUR, L. G., VAILLANT, C., LAREYRE, J. J. 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 346–364.

- KIDA, B.M.S., ABDALLA, R.P., MOREIRA, R.G. 2016. Effects of acidic water, aluminum, and manganese on testicular steroidogenesis in *Astyanax altiparanae*. *Fish Physiol. Biochem.* 42(5),1347-56.
- KRIEGSFELD, L.J., MEI, D.F., BENTLEY, G.E., UBUKA, T., MASON, A.O., INOUE, K., UKENA, K., TSUTSUI, K., SILVER, R. 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2410-2415.
- LEE, J. JI, K. KHO, Y.L., KIM, P., CHOI, K., 2011. Chronic Exposure to Diclofenac on Two Freshwater Cladocerans and Japanese Medaka, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74, 1216–1225.
- LETHIMONIER, C., MADIGOU, T., MUÑOZ-CUETO, J. A., LAREYRE, J.J., KAH, O. 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptor in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 1-16.
- LEVAVI-SIVAN, B., BOGERD, J., MAÑANÓS, E.L., GÓMEZ, A., LAREYRE, J.J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 65, 34–89.
- MAGLIULO-CEPRIANO, L., SCHREIBMAN, M.P., BLUM, V. 1994. Distribution of variant forms of immunoreactive gonadotropin releasing hormone and b-gonadotropins I and II in the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94, 135–150.
- MARTINI, A.C., VINCENTI, L.M., SANTILLÁN, M.E., STUTZ, G., KAPLAN, R., RUIZ, R.D., DE CUNEO, M.F. 2008. Chronic administration of nonsteroidal-antiinflammatory drugs (NSAIDS): effects upon mouse reproductive functions, *Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Nac. Cordoba.* 65, 47–59.
- MILLAR, R.P. 2003. GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrin Met.* 14, 1, 35-43.
- MYLONAS, C.C., FOSTIER, A., ZANUY, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516-534.

MUÑOZ-CUETO, J.A., PAULLADA-SALMERÓN, J.A., ALIAGA-GUERRERO, M., COWAN, M.E., PARHAR, I.S., UBUKA, T. 2017. A Journey through the Gonadotropin-inhibitory Hormone System of Fish. *Front. Endocrinol.* 8, 285.

NAGAHAMA, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International J. Develop. Biol.* 38, 217-229.

NAKATANI, K., AGOSTINHO, A.A., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, P.V., MAKRAKIS, M.C., PAVANELLI, C.S. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM. 378 p.

NISHI, K., CHIKAE, M., HATANO, Y., MIZUKAMI, H., YAMASHITA, M., SAKAKIBARA, R., TAMIYA, E. 2002. Development and Application of a Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA for Quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) Vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 132, 161–169.

NÓBREGA, R.H., JESUS, L.W.O., HONJI, R.M., BORELLA, M.I. 2016. Characterization of gonadotropic cells during continuous and seasonal spermatogenesis of two freshwater fish species: a histochemical and immunohistochemical study. *Fish Physiol. Biochem.* 43, 51–63.

PEREIRA DOS SANTOS, M., YASUI, G.S., XAVIER, P.L.P., ADAMOV, N.S.M., NASCIMENTO, N.F., FUJIMOTO, T., SENHORINI, J., NAKAGHI, L.S.O. 2016. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). *Zygote.* 24, 795-807.

PINHEIRO, J.P.S., ASSIS, C.B., MUÑOZ-PEÑUELA, M., JÚNIOR, F.B., CORREIA, T.G., MOREIRA, R.G. 2019. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). *Chemosphere.* 220, 266-274.

PORTO-FORESTI, F., CASTILHO-ALMEIDA, R.B., FORESTI, F. 2005. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), in: Baldisseroto, B., Gomes, L. C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil* - Editora UFSM, Santa Maria, pp. 470.

QUÉRAT, B. 1994. Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates, in: Davey, K. G., Peter, R. E., Tobe, S. S. (Eds.), *Perspective in Comparative Endocrinology - National Research Council of Canada, Ottawa*, pp. 27-35.

QI, X., ZHOU, W., LI, S., LU, D., Yi, S., XIE, R., LIU, X., ZHANG, Y., LIN, H. 2013. Evidences for the regulation of GnRH and GTH expression by GnIH in the goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol.* 366, 9–20.

RIBEIRO, C.S., MOREIRA, R.G. 202. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. *Rev. da Biol.*, 8, 58-61.

SCHULZ, R.W., VISCHER, H.F., CAVACO, J.E., SANTOS, E.M., TYLER, C.R., GOOS, H.J., BOGERD, J. 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 129, 407–17.

SIQUEIRA-SILVA, D.H., SILVA, A.P.S., NINHAUS-SILVEIRA, A., VERISSIMO-SILVEIRA, R. 2015. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. *Theriogenology.* 84, 1033-1042.

SMITH, J.T., ROSS YOUNG, I., VELDHUIS, J.D., CLARKE, I.J. 2012. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) secretion into the ovine hypophyseal portal system. *Endocrinol.* 153, 3368–3375.

SWANSON, P., DICKEY, J.T., CAMPBELL, B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 53–59

TSUTSUI, K., SAIGOH, E., UKENA, K., TERANISHI, H., FUJISAWA, Y., KIKUCHI, M., ISHII, S., SHARP, J.P. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 661-667.

TSUTSUI, K., UBUKA, T., SON, Y.L., BENTLEY, G.E., KRIEGSFELD, L.J., 2015. Contribution of GnIH Research to the Progress of Reproductive Neuroendocrinology. *Front. Endocrinol.* 6, 179.

UBUKA, T., INOUE, K., FUKUDA, Y., MIZUNO, T., UKENA, K., KRIEGSFELD, J., TSUTSUI, K. 2012. Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology.* 153, 373–385.

UBUKA, T., PARHAR, I., KRIEGSFELD, L.J., TSUTSUI, K. 2018. Editorial: the roles of GnIH in reproductive Function and Behavior. *Front. Endocrinol.* 6, 179.

WHITE, R.B., FERNALD, R.D. 1998. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112(1), 17-25.

ZHANG, Y., LI, S., LIU, Y., LU, D., CHEN, H., HUANG, X., LIU, X., MENG, Z., LIN, H., CHENG, C.H.K. 2010. Structural diversity of the gnih/gnih receptor system in teleost: Its involvement in early development and the negative control of LH release. *Peptides.* 31, 1034-1043.

YASUI, G.S., SENHORINI, J.A., SHIMODA, E., PEREIRA-SANTOS, M., NAKAGHI, L.S.O., FUJIMOTO, T., ARIAS-RODRIGUEZ, L., SILVA, L. A. 2015. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal.* 9:3, 464–470.