

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 12/06/2020.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**CONTROLE ENDÓCRINO E MOLECULAR  
ENVOLVIDOS NA ESPERMATOGÊNESE DE  
ZEBRAFISH (*Danio rerio*): EFEITOS DOS  
HORMÔNIOS CORTICOIDES E  
TIREOIDIANOS**

**Aldo Tovo Neto**

Botucatu, São Paulo

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**CONTROLE ENDÓCRINO E MOLECULAR  
ENVOLVIDOS NA ESPERMATOGÊNESE DE  
ZEBRAFISH (*Danio rerio*): EFEITOS DOS  
HORMÔNIOS CORTICOIDES E  
TIREOIDIANOS**

**Aldo Tovo Neto**

**Orientador: Dr. Rafael Henrique Nóbrega**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da Unesp, *campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Botucatu, São Paulo

2018

T736c Tovo Neto, Aldo  
Controle endócrino e molecular envolvidos na espermatogênese de zebrafish (*Danio rerio*) : efeitos dos hormônios corticoides e tireoidianos / Aldo Tovo Neto. -- Jaboticabal, 2018  
v, 87 p : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2018

Orientador: Rafael Henrique Nóbrega

Banca examinadora: Maeli Dal Pai, Renata Guimarães Moreira  
Whitton, Hamid Habibi, Gustavo Manuel Somoza

Bibliografia

1. Zebrafish. 2. Espermatogênese. 3. Expressão gênica. 4. Fsh.  
5. Hipotireoidismo. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CONTROLE ENDÓCRINO E MOLECULAR ENVOLVIDOS NA ESPERMATOGÊNESE DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*): EFEITOS DOS HORMÔNIOS CORTICOIDES E TIREOIDIANOS

AUTOR: ALDO TOVO NETO

ORIENTADOR: RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA

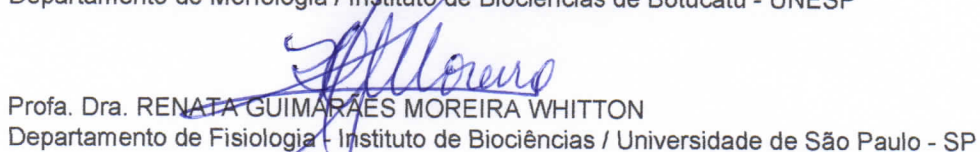
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA  
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Profa. Dra. MAELI DAL PAI  
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Profa. Dra. RENATA GUIMARAES MOREIRA WHITTON  
Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências / Universidade de São Paulo - SP

Prof. Dr. HAMID HABIBI  
. / Universidade de Calgary, Canadá



Prof. Dr. GUSTAVO MANUEL SOMOZA  
. / Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH)-Argentina



Jaboticabal, 12 de junho de 2018

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	8
1. Hormônio cortisol e definição de agentes estressores.....	15
2. Hormônios tireoidianos (HTs).....	21
3. O zebrafish ( <i>D. rerio</i> ) como modelo experimental.....	25
Objetivo Geral.....	26
Objetivos específicos.....	26
Referências.....	27
<b>CHAPTER II - CORTISOL PROTECTS TYPE A UNDIFFERENTIATED SPERMATOGONIA GAINST DIFFERENTIATION AND STIMULATES ZEBRAFISH SPERMATOGENESIS <i>IN VITRO</i></b> .....	38
Introduction.....	41
Material and Methods.....	42
Results.....	48
Discussion.....	54
Conclusion.....	57
References.....	58
<b>CAPÍTULO III - THYROID HORMONES ON ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>) SPERMATOGENESIS</b> .....	65
Introduction.....	67
Material and Methods.....	68
Results and Discussion.....	71
Conclusion.....	81
References.....	82
<b>GENERAL CONCLUSION</b> .....	85
<b>APPENDIX</b> .....	87

## DEDICATÓRIA

*“Aos meus pais, Suely Sandra S. Tovo e Paulo Reinaldo Tovo (in memoriam), por não pouparem esforços para minha educação, os quais me fizeram chegar até aqui, DEDICO”.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Unesp (CAUNESP), pela oportunidade de cursar Doutorado nesta Instituição.

Ao Departamento de Morfologia da Unesp, *campus* de Botucatu.

Ao prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega (Orientador), pela confiança depositada e orientação durante esses 4 anos de curso, assim como pelo conhecimento compartilhado, que muito me fizeram crescer profissionalmente.

Ao Dr. Emanuel Martinez (Coorientador), pelos ensinamentos práticos e teóricos, que foram decisivos para o desenvolvimento desta tese.

Ao Dr. Hamid Habibi (University of Calgary), por me receber em seu laboratório durante o estágio no exterior.

Aos colegas de laboratório, Reproductive and Molecular Biology Group, pelo companheirismo, troca de conhecimentos e ajuda nos experimentos.

Aos colegas, Aline Melo, Giovana Branco e Arno Butzge, pela ajuda com os experimentos de cultura com o cortisol.

À amiga Maira Rodrigues, pela ajuda com as análises histológicas e figuras desta Tese.

Aos colegas de laboratório, HRH Lab, pelo companheirismo, troca de conhecimentos e ajuda nos experimentos.

Ao técnico José Eduardo Bozzano, pela disponibilidade em ajudar sempre.

À Prof. Dra. Renata Guimarães, por disponibilizar seu laboratório para os ensaios de ELISA. Gostaria de agradecer também ao Renato Honji, pela ajuda nas análises de ELISA.

À minha noiva, Tamara Galvão, pelo companheirismo e apoio durante essa longa caminhada do Doutorado.



## **APOIO FINANCEIRO**

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

O presente trabalho também foi realizado com apoio da FAPESP, através do convênio FAPESP/CAPES, PROCESSO nº 2014/16280-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa no país; e PROCESSO nº 2017/09218-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estágio no exterior (BEPE).

O presente trabalho também foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Programa “Ciência Sem Fronteiras”, pela concessão da bolsa no exterior (Processo 234548/2014-2).

## RESUMO

Diversas pesquisas deixam claro que os hormônios do metabolismo como o cortisol e hormônios tireoidianos (HTs, T3 e T4) podem influenciar a reprodução de peixes diretamente afetando hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, ou indiretamente por diferentes mecanismos. Embora os efeitos do cortisol na reprodução tenham sido estudados extensivamente, os efeitos diretos à nível gonadal receberam menos atenção nesse processo. Em relação aos HTs, estudos mostram uma correlação positiva entre HTs e o status reprodutivo, onde os HTs são frequentemente associados com o desenvolvimento testicular, crescimento e maturação. O objetivo desta tese foi estudar os efeitos do cortisol e HTs na espermatogênese de zebrafish utilizando cultura de órgãos *ex vivo*. Foram avaliados a proliferação de células germinativas, quantificação de cistos germinativos, liberação de andrógenos (ELISA) e expressão de genes testiculares. O cortisol tem um efeito positivo na espermatogênese estimulando a diferenciação de células germinativas e aumentando a quantidade de espermatozoides no lúmen, de forma independente de andrógeno. O T3 afetou a expressão de genes expressos em células germinativas, enquanto o T4 não alterou a expressão destes genes. Além disso, os estudos *in vivo* mostraram que o metimazol aumentou a área ocupada pelas espermatogônias do tipo A e tipo B, enquanto que a área do lúmen e a quantidade de espermatozoides reduziram significativamente, sugerindo que o hipotireoidismo induzido prejudica a meiose, além de modular a expressão de genes nas células de Sertoli e Leydig.

## PALAVRAS-CHAVE

zebrafish, espermatogênese, expressão gênica, Fsh, hipotireoidismo.

## ABSTRACT

It has been increasingly clear that metabolic hormones such as cortisol and thyroid hormones (THs, T3 and T4) can also influence fish reproduction either directly by affecting hormones of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis or indirectly by different mechanisms. Although the effects of cortisol in reproduction were extensively studied, direct effects at gonadal level has received less attention in this process. Regarding THs, it has been shown a positive correlation between THs and fish reproductive status, where THs are frequently associated with testicular development, growth and maturation. The aim of this thesis was to study the effects of cortisol and THs on zebrafish spermatogenesis using an *ex vivo* organs culture. We evaluated germ cell proliferation activity, quantification of germ cysts, androgen release by ELISA and the mRNA expression of testicular genes. Cortisol has a positive role in zebrafish spermatogenesis by stimulating germ cells differentiation and increase of free spermatozoa in the lumen, in an androgen independent manner. T3 affected germ cells related genes, while T4 did not alter these evaluated genes. Moreover, *in vivo* studies showed that methimazole increased the area occupied by the undifferentiated type A spermatogonia and type B spermatogonia, while spermatozoa and the lumen area were reduced significantly, which suggests that hypothyroidism-induced impairs meiosis and modulates the mRNA expression of Sertoli and Leydig cells genes.

## KEYWORDS

zebrafish, spermatogenesis, gene expression, Fsh, hypothyroidism.

# Capítulo I

## Introdução Geral

Este capítulo foi parcialmente publicado como revisão na revista “General and Comparative Endocrinology” (anexo)

TOVO-NETO, A.; RODRIGUES, M.S.; HABIBI, H.R.; NÓBREGA, R.H. 2018. Thyroid hormones action on male reproductive system of teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.023>

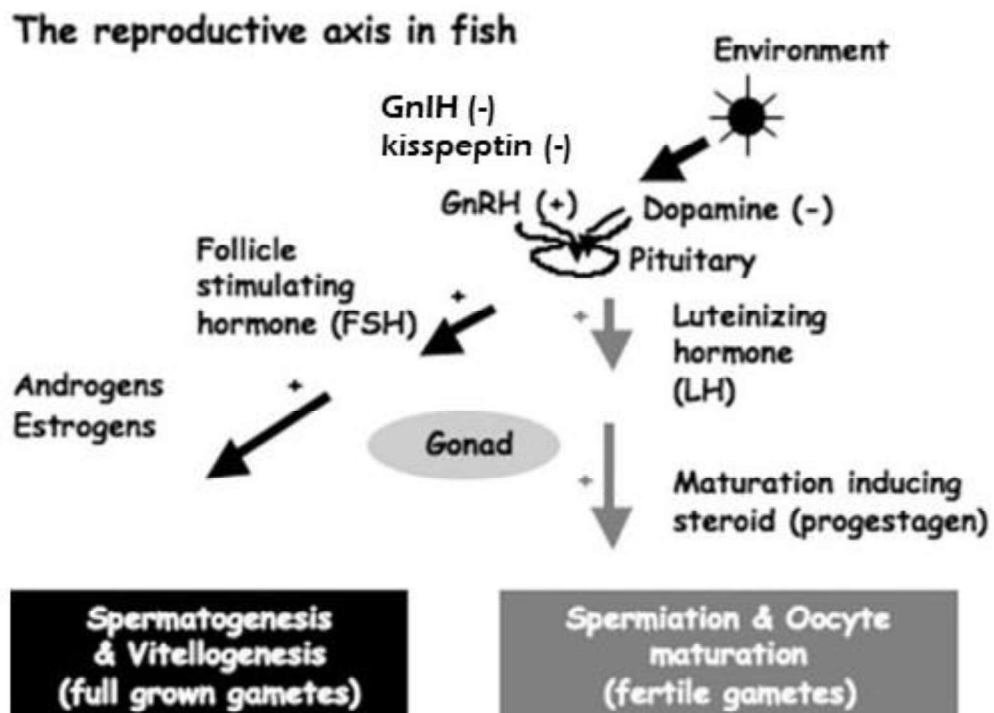
### *Processo reprodutivo em peixes*

O processo reprodutivo em peixes, como nos demais vertebrados, é dependente do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG). Este eixo se inicia com a produção hormônio liberador de gonadotrofina (*gonadotropin releasing hormone*, GnRH). O GnRH é um decapeptídeo, conhecido por regular a síntese e liberação dos hormônios gonadotróficos (GtHs), hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), que por sua vez, estimulam a função gonadal nos vertebrados via indução da síntese de esteroides sexuais (ANDREU-VIEYRA e HABIBI, 2007).

Os vertebrados (incluindo os peixes) expressam duas ou mais formas de GnRHs, sendo que até o momento, oito formas já foram reportadas entre os peixes teleósteos (ZOHAR et al., 2010). Os GnRHs são expressos em inúmeros tecidos, mas a forma produzida no hipotálamo parece ter um papel primário na ativação do eixo HPG via estimulação sináptica das células produtoras de gonadotrofinas (gonadotrófos) (PANKHURST, 2016).

Em algumas espécies de peixes, a produção destas gonadotrofinas (FSH e LH) está sob a ação inibitória de neurônios produtores de dopamina (Figura 1). Desta forma, o balanço entre a ação inibitória da dopamina e a estimulatória do GnRH, modulam a síntese e liberação de gonadotrofinas (DUFOUR et al., 2010). O efeito inibitório da dopamina foi demonstrado em algumas ordens de teleósteos, tais como Cypriniformes, Salmoniformes, Siluriformes, Cichliformes e Mugiliformes (veja DUFOUR et al., 2010).

Além disso, em um estudo mais recente foi descrito, outro mecanismo que modula a síntese e liberação de GnRH que ocorre através do sistema kisspeptina, o qual parece ser responsável por transformar estímulos ambientais exógenos e endógenos em efeitos no sistema reprodutivo (Figura 1) (ZOHAR et al., 2010; SHAHJAHAN et al., 2013). Por fim, estudos recentes descobriram outro neuropeptídeo hipotalâmico, conhecido como hormônio inibidor das gonadotrofinas (GnIH), que inibe a síntese e a liberação de gonadotrofinas (Figura 1) (TSUTSUI et al., 2018).



**Figura 1.** Visão esquemática do eixo reprodutivo de peixes. A partir dos estímulos ambientais, estimula a síntese e secreção do GnRH, hormônio liberador de gonadotrofina. Entretanto, a liberação do GnRH é regulada pelo hormônio inibidor de gonadotrofina (GnIH), kisspeptinas e Dopamina. O GnRH estimula a produção das gonadotrofinas FSH (hormônio foliculo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), as quais vão agir localmente nas gônadas e irão estimular a produção de andrógenos, estrógenos e progestágenos. Modificado de MYLONAS et al., 2010.

As gonadotrofinas (Fsh e Lh) são glicoproteínas formadas por duas subunidades diferentes, a subunidade  $\alpha$ , comum aos dois hormônios e a subunidade  $\beta$ , específica de acordo com a atividade biológica de cada hormônio (SCHULZ et al., 2001). Estes dois hormônios gonadotróficos possuem papel crucial na regulação da espermatogênese (PIERCE e PARSONS, 1981). Quando liberadas na corrente sanguínea, as gonadotrofinas exercem sua atividade biológica na via receptores de proteínas G. Com exceção da classe dos Agnathas (lampréias e hagfishes) que possuem somente uma glicoproteína (SOWER et al., 2009), a presença de ambos FSH e LH e respectivos receptores é bem documentada nos vertebrados em geral (SCHULZ et al., 2010), e ambas gonadotrofinas desempenham diferentes papéis nas gônadas.

Em mamíferos, ambas as gonadotrofinas são claramente definidas, dadas as interações altamente específicas entre cada hormônio e seu respectivo

receptor (GÁRCIA-LOPEZ et al., 2010). O Lh (hormônio luteinizante) atua na esteroidogênese das células de Leydig e o Fsh (hormônio folículo estimulante) regula a função das células de Sertoli.

Em peixes teleósteos, o Fsh também atua nas células de Leydig pois tais células apresentam receptores de Fsh como descrito em *Clarias gariepinus* (GARCIA-LOPEZ et al., 2009) e *Danio rerio* (GARCIA-LOPEZ et al., 2010). As células de Leydig estão no compartimento intertubular dos testículos geralmente localizadas ao redor de vasos sanguíneos (LEAL et al., 2009). As células de Leydig são responsáveis pela produção de andrógenos e fatores de crescimento (SCHULZ et al., 2010).

#### *Processo de espermatogênese em mamíferos e peixes*

A espermatogênese é um processo altamente conservado entre os cordados e compreende uma série de eventos altamente precisos e coordenados, nos quais uma única espermatogônia tronco se diferencia para originar milhares de espermatozoides. Este processo é dividido em três grandes fases (RUSSELL et al., 1990; SHARPE, 1994; FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005; NÓBREGA et al., 2009; SCHULZ et al., 2010): (1) fase espermatogonial ou proliferativa, caracterizada por sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias; (2) fase espermatocitária ou meiótica, em que o material genético dos espermatócitos é duplicado, recombinado e segregado, formando células haplóides denominadas de espermátides; e (3) fase espermiogênica ou de diferenciação, na qual as espermátides passam por modificações estruturais e funcionais altamente complexas para originar os espermatozoides, que estão aptos para a fecundação.

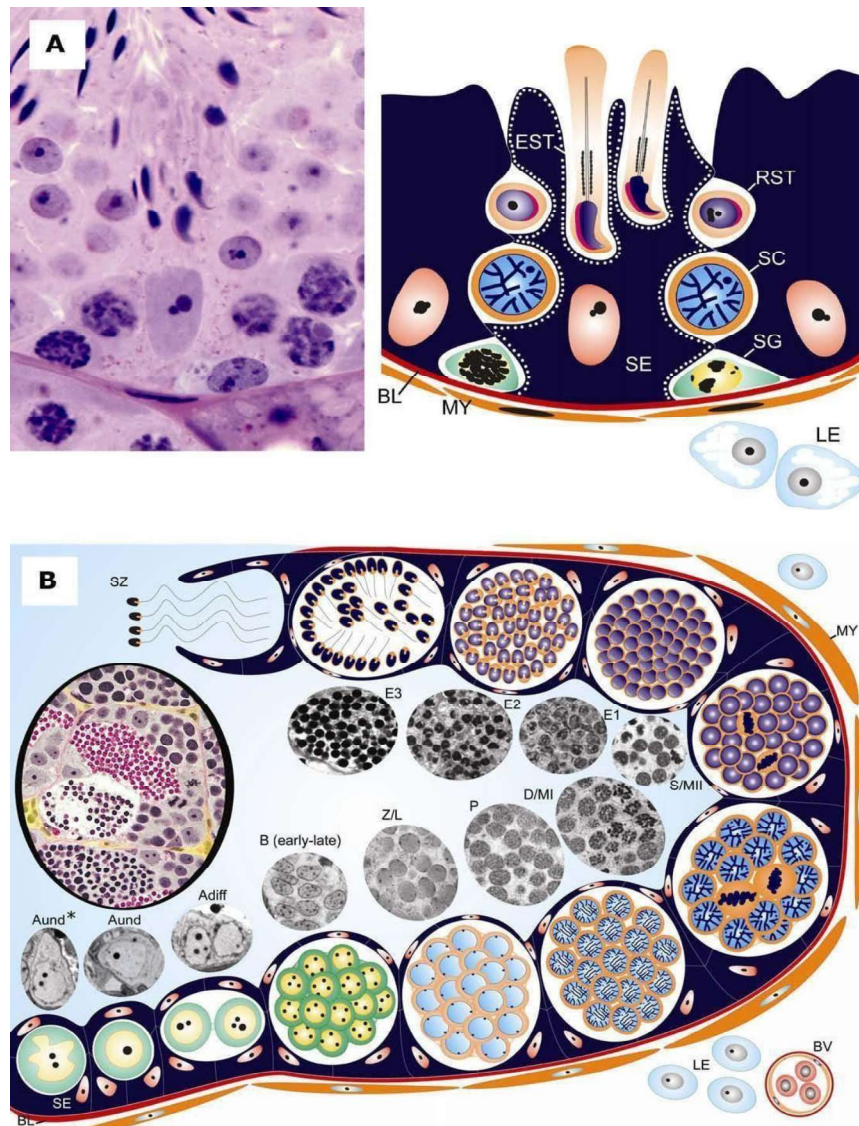
Embora altamente conservada, a espermatogênese apresenta certas peculiaridades em termos de sua unidade morfofuncional dependendo do grupo de estudo. Em peixes teleósteos, por exemplo, a espermatogênese ocorre no interior de estruturas denominadas espermatocistos, ou cistos, que se formam quando uma única espermatogônia primária ou do tipo A é completamente envolvida pelos prolongamentos das células de Sertoli (Figura 2) (GRIER, 1993; PUDNEY, 1993, 1995; SCHULZ et al., 2010). As células germinativas derivadas desta espermatogônia dividem-se sincronicamente para constituir um clone de

células germinativas que é envolvido por um número variado de células de Sertoli, dependendo do tipo de cisto (VILELA et al., 2003).

Diferente dos mamíferos, onde as células de Sertoli estão em contato com várias gerações de células germinativas (Figura 2A) (RUSSELL et al., 1990), na espermatogênese cística as células de Sertoli normalmente estão em contato com apenas um tipo específico de célula germinativa durante a evolução do processo espermatogênico (Figura 2B) (NÓBREGA et al., 2009; SCHULZ et al., 2010). Estes cistos encontram-se apoiados na túnica própria dos túbulos seminíferos, que é formada por uma camada acelular denominada de membrana basal e pelas células peritubulares mióides (Figura 2B) (KOULISH et al., 2002).

Nos vertebrados em geral, o testículo é composto de dois compartimentos principais, o compartimento intertubular (ou intersticial), e o compartimento tubular (SCHULZ et al., 2010). O compartimento intertubular abriga as células de Leydig, vasos sanguíneo/linfáticos, macrófagos e mastócitos, células de tecido conectivo e neural envolvidos pela túnica albugínea (KOULISH et al., 2002). Já o compartimento tubular é delineado pela membrana basal e as células mióides peritubulares, abrigando também o epitélio germinativo (SCHULZ et al., 2010). O epitélio germinativo é composto por dois tipos celulares, as células somáticas (Sertoli) e as células germinativas, estas últimas sendo encontradas em diferentes estágios de desenvolvimento (SCHULZ et al., 2010). *In vivo*, as células germinativas somente podem sobreviver em contato e contínua interação com as células de Sertoli (SCHULZ et al., 2010). Dessa forma, o número de células de Sertoli determina a capacidade espermatogênica do testículo, o que é um importante alvo na sinalização regulando a espermatogênese (MATTA et al., 2002).





**Figura 2.** Comparação entre a espermatogênese não-cística de amniotas (répteis, aves, mamíferos) (A) e anamniotas (peixes, anfíbios) (B). A figura ilustra as diferenças entre a relação célula de Sertoli/célula germinativa na espermatogênese não-cística e cística. Em A, a célula de Sertoli suporta ao mesmo tempo diferentes clones de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento. Enquanto que em B, a célula de Sertoli suporta apenas um clone em uma mesma fase de desenvolvimento por vez. Legendas: células de Sertoli (SE); lâmina basal (BL); células peritubulares mióides (MY), células de Leydig (LE), espermatogônia (SG); espermatócito (SC); espermátide arredondada (RST); espermátide alongada (EST); espermatogônia do tipo A indiferenciada\* (Aund\*) (célula tronco?); espermatogônia do tipo A indiferenciada (Aund); espermatogônia do tipo A diferenciada (Adiff); espermatogônia do tipo B (B early-late); espermatócitos primários em leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno/metáfase I (D/MI); espermatócitos secundários/metáfase II (S/MII); espermátides iniciais (E1); intermediárias (E2); finais (E3); espermatozóides (SZ); e vasos sanguíneos (BV). Retirado de SCHULZ et al., 2010.

Em pássaros e mamíferos, as células de Sertoli proliferam até a puberdade de modo que no testículo adulto, um determinado número de células de Sertoli residentes pós-mitóticas, podem suportar sucessivas ondas de espermatogênese (FRANÇA et al., 2015). Durante essas ondas de espermatogênese, um certo

número de células de Sertoli suportam vários tipos de células germinativas ao mesmo tempo (Figura 2A) (SCHULZ et al., 2010). Já nos vertebrados anamniotas (peixes e anfíbios), por outro lado, a unidade funcional do epitélio germinativo é o cisto espermatogênico (Figura 2B) (FRANÇA et al., 2015). Esses cistos consistem inicialmente de uma espermatogônia envolta pelas extensões citoplasmáticas das células de Sertoli (FRANÇA et al., 2015). Quando esses cistos entram no processo espermatogênico, ambas as células de Sertoli e células germinativas entram em processo de diferenciação (SCHULZ et al., 2010). Um número específico de células de Sertoli é associado com um número em determinado estágio da espermatogênese, estabelecendo uma razão previsível entre células de Sertoli/germinativas para o desenvolvimento de determinado número de células germinativas (FRANÇA et al., 2015).

#### *Hormônios do metabolismo e sua relação com a reprodução*

A reprodução em vertebrados é controlada pelo eixo HPG, tendo alguns elementos-chaves neste processo como o GnRH e as gonadotrofinas (Fsh e Lh). Entretanto, sabe-se que os hormônios relacionados com o metabolismo (como o cortisol e hormônios tireoidianos, por exemplo) também exercem papéis no processo reprodutivo numa atuação orquestrada entre os eixos hipotalâmico-pituitário-tireoide (HPT), hipotalâmico-hipofisário-interrenal (HPI) e o HPG.

Os níveis elevados de cortisol plasmático desencadeiam inúmeras respostas no organismo, incluindo impactos no processo reprodutivo, quando em condições de estresse. De forma geral, os trabalhos na literatura têm reportado tanto efeitos inibitórios como estimulatórios do cortisol na reprodução (CARRAGHER et al., 1989; CARRAGHER e SUMPTER, 1990; CAMPBELL et al., 1992; CAMPBELL et al., 1994). Vale mencionar que os peixes estão expostos às situações de estresse frequentemente, seja por problemas com a baixa qualidade de água (poluição), alta densidade, manejo dos animais e o próprio confinamento. Dessa forma, estudos para elucidar os efeitos do estresse/cortisol, sejam no metabolismo e/ou processo reprodutivo, são de extrema importância, pois ajudam a entender como funciona a ação conjunta dos eixos.

Além disso, inúmeros estudos têm mostrado que os hormônios tireoidianos também exercem um importante papel no sistema reprodutivo dos vertebrados, incluindo os peixes (CYR e EALES, 1996, BLANTON e SPECKER, 2007), HABIBI et al. (2012) e FLOOD et al. (2013). Sendo assim, é importante direcionar as pesquisas no sentido de entender também o papel dos HTs na reprodução dos peixes e a interação entre os eixos do metabolismo e o da reprodução.

### *1. Hormônio cortisol e definição de agentes estressores*

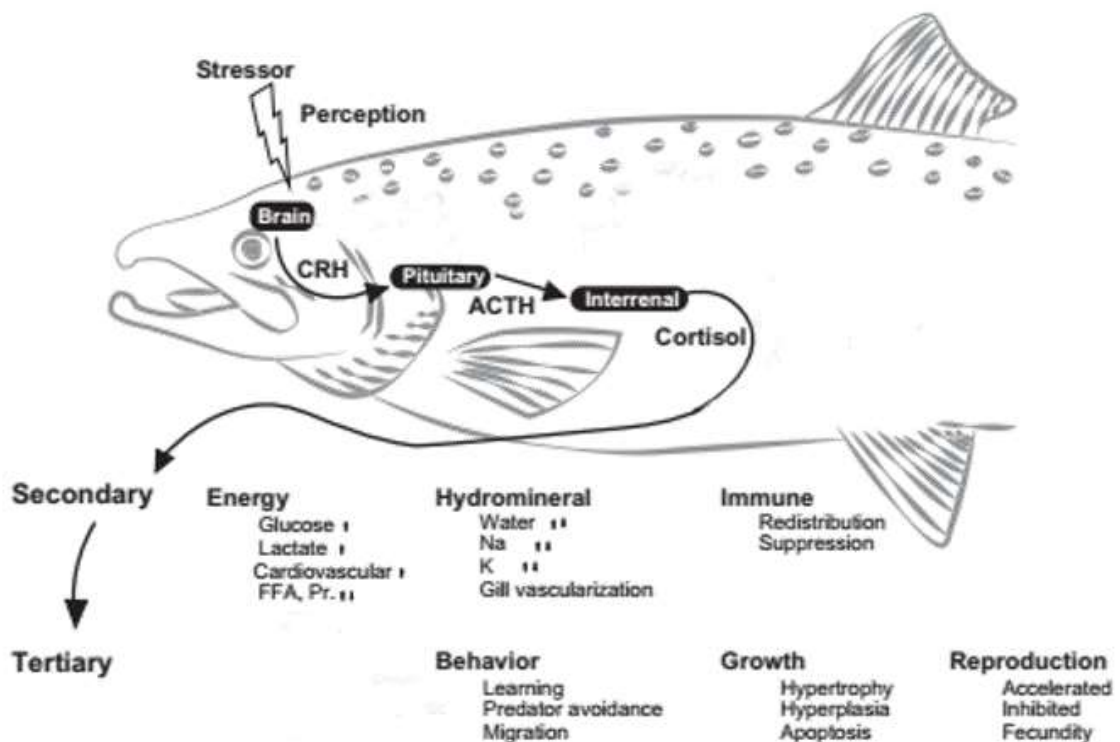
O cortisol é o principal glicocorticoide em peixes teleósteos, sendo sintetizado e liberado em situações de estresse. Deve-se mencionar que os peixes adultos estão expostos diariamente a situações de estresse seja na natureza, ou sob condição de criação ou confinamento (SCHRECK et al., 2001). Brevemente será abordada a definição de situação de estresse para contextualizar a importância e ação do cortisol para os peixes.

Agentes estressores podem variar desde uma situação muito rápida (aguda), por exemplo, uma situação em que o peixe está sendo pego na rede ou escapando de um predador; até aquelas situações que são mais prolongadas e permanentes (crônico), como exemplo quando os animais estão em um tanque com alta densidade ou quando os animais ocupam a classe mais baixa na hierarquia de comunidade (SCHRECK e TORT, 2016). Os termos “agudo” e “crônico” são dependentes do contexto e difíceis de definir.

Existem três estágios principais da resposta ao estresse: alarme, resistência e compensação ou exaustão (morte) (SELYE, 1950; SCHRECK, 2000). A natureza (magnitude e duração) da resposta ao estresse é dependente da severidade e duração do agente estressor. Essencialmente a fase de alarme (ou resposta primária) consiste no estímulo do sistema locomotor (envolvidos na fuga, voo, luta, ou mesmo para simplesmente sobreviver à essa condição, por exemplo, é fase de ativação do eixo interrenal) (Figura 3). A resposta secundária inclui respostas do sistema cardiovascular e respiratório (RODNICK e PLANAS, 2016), as quais aumentam a distribuição de oxigênio e disponibilizam substrato de energia na circulação como resultado da resposta ao estresse (Figura 3). Outras respostas (secundárias) são a disfunção hidromineral, pois a adrenalina altera o

fluxo de sangue para as brânquias e permeabilidade destas, impactando no gradiente osmótico, assim, deixando fluir a água para dentro ou fora do animal de acordo com a salinidade do ambiente (Figura 3) (TAKEI e HWANG, 2016). A Resposta terciária seria mais relacionada aos efeitos em longo prazo, como comportamento, crescimento do animal e reprodução (Figura 3).

A primeira resposta do sistema endócrino frente ao agente estressor é a rápida elevação do nível de epinefrina no plasma (a catecolamina predominante) assim como os níveis de cortisol, principal glicocorticoide em peixes (Figura 3) (REID et al., 1998; MOMMSEN et al., 1999). Em outras palavras, o agente estressor induz a cascata neuroendócrina envolvendo a liberação imediata de catecolaminas e ativação do eixo HPI (SCHRECK et al., 2001).



**Figura 3.** Visão esquemática dos efeitos causados pelo agente estressor em peixes. A primeira resposta é à nível do eixo hipotalâmico-hipofisário-interrenal e eventos cascata a baixo que culminam na liberação de catecolaminas e cortisol. A resposta secundária interfere em processos como: balanço de energia, hidromineral e resposta imune. A resposta terciária está relacionada a alterações no comportamento, crescimento e reprodução. Retirado de SCHRECK e TORT (2016).

Outra particularidade, o eixo hipotalâmico-hipofisário-interrenal (HPI) presente nos teleósteos é diferente daquele encontrado em mamíferos (eixo

hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) (WENDERLAAR BONGA, 1997). De maneira diferente, o tecido interrenal nos peixes teleósteos se localiza dentro da parte anterior dos rins e é homólogo ao córtex adrenal em mamíferos (MILLA et al., 2009).

#### *Eixo hipotalâmico-hipofisário-interrenal-gonadal e a produção de cortisol*

A secreção de cortisol está sob o controle do eixo HPI em peixes (WENDERLAR BONGA, 1997; MOMMENSEN et al., 1999). O fator liberador de cortisol (CRF) é secretado a partir de neurônios hipotalâmicos e estimulam a síntese do hormônio corticotrófico (ACTH) (ALURU e VIJAHAN, 2009). O ACTH é produzido na hipófise, e esse peptídeo pituitário se liga ao receptor de melanocortina 2 (MCR2) nas células esteroideogênicas no tecido interrenal levando a corticoesteroidogênese (ALURU e VIJAHAN, 2008).

A via de sinalização do cortisol em tecidos-alvo envolve a ativação de receptores corticoesteroides, da família de receptores nucleares (ALURU e VIJAHAN, 2009). Entretanto, os receptores de mineralcorticoides também podem atuar como ligantes fisiológicos para o cortisol (STURM et al., 2005). Na espécie de peixe *Haplochromis burtoni*, a sensibilidade do receptor de mineralcorticoide parece ser similar àquela encontrada em mamíferos, sendo mais sensível para ambos - cortisol e aldosterona (mineralcorticoide) - quando comparado aos receptores de glicocorticoides (GREENWOOD et al., 2003). A expressão gênica dos receptores de corticoesteroides (glico e mineralcorticoides) foi encontrada nas gônadas masculina e feminina (MILLA et al., 2009). Ambos receptores foram também identificados em testículo de truta arco-íris e outras espécies de peixes (COLOMBE et al., 2000; PARK et al., 2007; FILBY e TYLER, 2007; MILLA et al., 2008). No testículo de peixes, o receptor de mineralcorticoide é estrategicamente localizado ao longo do eixo reprodutivo e conseqüentemente em posição de regular a função reprodutiva (MILLA et al., 2008).

#### *O papel do cortisol na reprodução de peixes*

Os dados de efeitos do estresse ou administração do cortisol nos níveis plasmáticos dos esteroides gonadais são, de forma geral, controversos (CASTRANOVA et al., 2005). O estresse mostrou reduzir os níveis de testosterona (T) em truta arco-íris (CARRAGHER et al., 1989) e 11 ketotestosterona (11-KT) em truta marrom (PICKERING et al., 1987; CAMPBELL et al., 1994), e similarmente em *Acanthopagrus butcheri* (HADDY e PANKHURST, 1999). Por outro lado, em outro estudo, implantes de cortisol aplicados em machos de truta arco-íris e marrom em maturação não alteraram os níveis de 11-KT comparados ao grupo controle (CARRAGHER et al., 1989).

Em fêmeas, o estresse pode resultar na redução dos níveis de T e estradiol (E<sub>2</sub>) (CAMPBELL et al., 1994; HADDY e PANKHURST, 1999; CLEARY et al., 2000). Esse efeito do estresse nos esteroides gonadais tem sido atribuído ao efeito do cortisol inibindo esteroidogênese ovariana em folículos de truta arco-íris (CARRAGHER e SUMPTER, 1990). O estresse teve efeito negativo também nos níveis de vitelogenina em truta brook (*Salvelinus fontinalis*) (ROY et al., 1990), assim como o cortisol retardou o crescimento do oócito acompanhado de redução nos níveis plasmáticos de testosterona e 17β-oestradiol em tilápia (*Oreochromis niloticus*) (FOO e LAM, 1993). Entretanto, a adição de cortisol *in vitro* não inibiu a produção ovariana de T e E<sub>2</sub> em goldfish, carpa comum e *Pagrus auratus* (PANKHURST et al., 1995).

Inúmeros trabalhos reportam a correlação entre os níveis de cortisol no plasma e a fase reprodutiva do animal, demonstrando picos de cortisol durante a fase reprodutiva (CARRAGHER et al., 1989; CARRAGHER e SUMPTER, 1990; 1990; CAMPBELL et al., 1992; CAMPBELL et al., 1994). Além disso, o cortisol também é importante para a mobilização de reservas de energia (e.g. catabolismo proteico, lipólise, gliconeogênese) durante a maturação gonadal final em peixes (DICKHOFF et al., 1989).

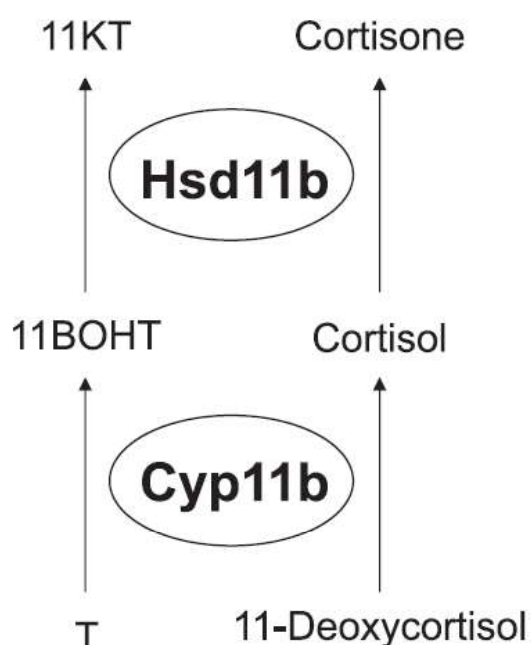
Experimentalmente, a adição de cortisol na ração afetou o desenvolvimento testicular de carpas, retardando a maturação gonadal nesses animais (CONSTEN et al., 2001). O tratamento com acetato de hidrocortisona em machos de *Labeo gonius* causou redução no volume e comprimento dos testículos, e conseqüente redução do IGS (índice gonadossomático) (JOSHI, 1982). Similarmente, quando o

cortisol foi administrado na forma de implantes durante a fase de maturação da truta marrom, este reduziu o tamanho dos testículos dos animais (CARRAGHER et al., 1989).

Outra evidência da importância do cortisol na reprodução de peixes é o fato dele participar também do processo de reversão sexual. YAMAGUCHI e colaboradores (2010) demonstraram que o cortisol está envolvido na reversão sexual de fêmeas para machos de linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*), devido a inibição da aromatase *cyp19a1*. Além disso, o inibidor de síntese do cortisol (*metirapone*) impede a masculinização de fêmeas de linguado japonês em temperaturas elevadas, sugerindo que o cortisol induz a reversão sexual nesta espécie. A administração exógena de cortisol induz à apoptose das células germinativas na gônada, aumento da expressão do *amh* e diminuição da aromatase gonadal *cyp19a1* nas larvas de pejerrey (HATTORI et al., 2009).

Uma possível via regulada pelo cortisol é a enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (11 $\beta$ HSD). Em peixes, somente uma enzima 11 $\beta$ -Hsd foi descrita até o momento, e ela é considerada homóloga à 11 $\beta$ -HSD2 encontrada em mamíferos (BAKER, 2004). Entretanto, a importância da 11 $\beta$ -Hsd2 para o metabolismo dos glicocorticóides em peixes ainda não está clara, mas certamente está envolvida no processo final da biossíntese de 11-Ketotestosterona (11-KT) (Figura 4), o qual é o principal andrógeno nos peixes (FERNANDINO et al., 2012).

## Cross-talk between glucocorticoid and androgen pathways



**Figura 4** – Representação esquemática mostrando a relação entre as vias androgênica e metabolismo do cortisol. Dois tipos da enzima 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase - HSD11B1 e HSD11B2 – foram identificadas e caracterizadas em mamíferos (Albiston et al., 1994). Em peixes, entretanto, somente um tipo desta enzima foi identificado (Hsd11b2) em algumas espécies. Esta enzima está envolvida em tanto no metabolismo do Cortisol em Cortisona, quanto no metabolismo do 11 $\beta$ -hidroxitesterona (11B-OHT) em 11 cetotesterona (11-KT). T, testosterona; Cyp11b, 11- $\beta$  hidroxilase. Retirado de GOIKOETXEA et al. (2017).

### *Efeitos do estresse e cortisol na espermatogênese de peixes*

Em mamíferos, o cortisol parece ter um efeito inibitório durante todo o processo de espermatogênese (WEBER et al., 2000). Os glicocorticoides inibem a produção de testosterona pelas células de Leydig por uma via mediada pelos receptores de glicocorticoides (GE et al., 2005). Os glicocorticoides podem também induzir a apoptose de espermatogônias e espermatócitos, assim como diminuir o rendimento espermático (GAO et al., 2003; WAGNER e CLAUS, 2004). A atividade da enzima 11 $\beta$ HSD2 nas células de Leydig e Sertoli protegeria o testículo de efeitos adversos do cortisol convertendo esses hormônios em cortisona ou 11-dihidrocortisterona, respectivamente (Figura 4) (NACHARAJU et al., 1997; GE et al., 2005).



Em peixes, geralmente o nível de cortisol no plasma apresenta baixos níveis durante a fase de espermatogênese (PICKERING e CHRISTIE, 1981; HOU et al., 2001), que pode ser devido à uma adaptação fisiológica para proteger os testículos de possíveis efeitos adversos do cortisol (POTTINGER et al., 1995). De fato, existem relatos de que o cortisol retardou o desenvolvimento testicular atrasando a puberdade em carpas, efeito que parece ser independente de LH (hormônio luteinizante) (CONSTEN et al., 2001). Interessantemente, em outro estudo com carpa comum (*Cyprinus carpio*), a administração do RU-486 (potente antagonista do receptor de glicocorticoide) preveniu o efeito da diminuição do crescimento gonadal e atraso do início da espermatogênese (induzidos pelo cortisol), mostrando que os efeitos do cortisol são mediados via receptor de glicocorticoide (GOOS e CONSTEN, 2002).

Não obstante, outro estudo *in vitro* incubando testículos de enguia japonesa (*Anguilla japonica*) na presença do cortisol, reporta que o cortisol aumentou a replicação de DNA e a mitose das espermatogônias em doses de 0.1 a 100 ng/mL (OKAZAKI et al., 2006), estimulando também a liberação de 11-KT no nível de 100 ng/mL. Em outro estudo com adição de cortisol na ração (20, 40 e 60µg/ peixe), mostram que o cortisol promoveu a espermatogênese e aumentou o índice gonado-somático (IGS) em *Notopterus notopterus* (SHANKAR E KULKARNI, 2000), novamente um efeito positivo do cortisol na espermatogênese.

O cortisol inibiu *in vivo* a secreção dos esteroides durante a fase de espermatogênese. Em trabalhos com agentes estressores ou aplicação de cortisol durante a espermatogênese em peixes reduziram os níveis de andrógenos nos peixes tratados, quando comparados ao controle (PICKERING et al., 1987; CARRAGHER et al., 1989; POTTINGER, 1999; GOOS e CONSTEN, 2002; CONSTEN et al., 2002; LISTER et al., 2008). Essas observações sugerem que o efeito do cortisol no retardamento da espermatogênese *in vivo* pode ser parcialmente pela inibição da produção de andrógenos (CONSTEN et al., 2002; PICKERING et al., 1987; SCOTT e BAYNES, 1982).

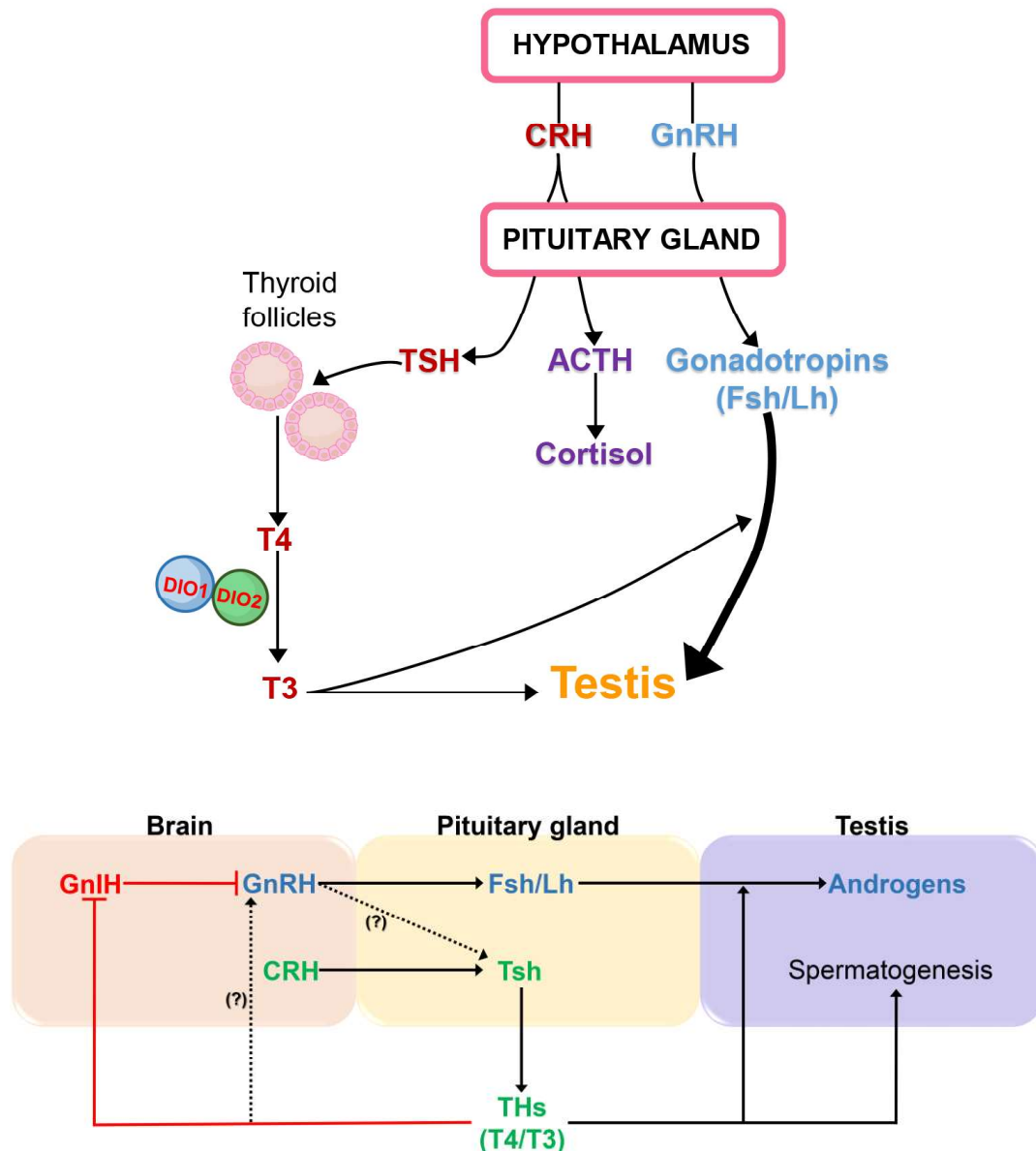
## 2. Hormônios tireoidianos (HTs)

Os hormônios tireoidianos (HTs) são conhecidos pelo seu envolvimento em inúmeros processos biológicos como crescimento, morfogênese, pigmentação da pele, osmorregulação e reprodução (BLANTON e SPECKER, 2007). Em relação à reprodução, há um número crescente de estudos mostram que os HTs exercem um importante papel no sistema reprodutivo masculino em vertebrados.

#### *O eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoide em peixes*

O funcionamento da tireoide é ativado pelo HPT, o qual foi revisado em vertebrados incluindo peixes (BROWN e CAI, 2007; BLANTON e SPECKER, 2007; CARR e PATIÑO, 2011). Uma característica particular do eixo HPT em peixes é a ausência do hormônio liberador de tireotrofinas (TRH) (Figura 5), como ocorre em mamíferos (LARSEN et al., 1998). Por outro lado, a secreção do hormônio estimulante da tireoide (TSH) em peixes parece ser dependente do hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) (Figura 5) (LARSEN et al., 1998), semelhante ao encontrado em anfíbios, répteis e aves (De GROEF et al., 2003; CASTAÑEDA CORTÉS et al., 2014).

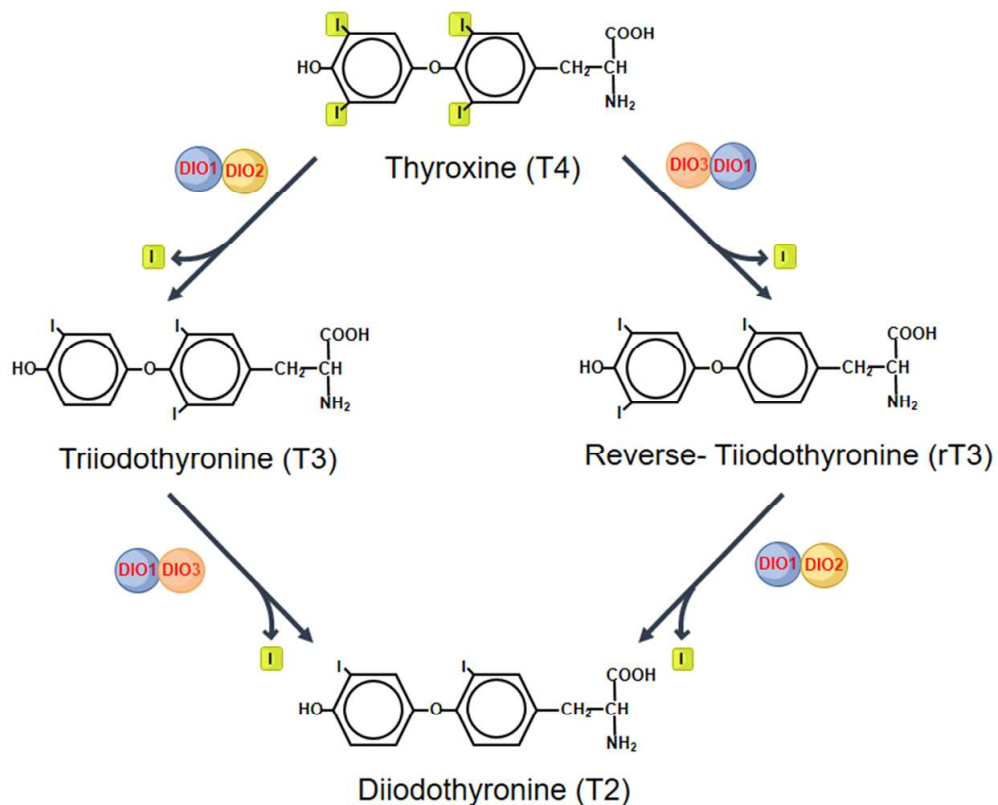
O TSH secretado, por sua vez, estimula a síntese e liberação dos hormônios tireoidianos pelos folículos tireoidianos (Figura 5). Nos peixes, os folículos tireoidianos não são encapsulados em um órgão, mas sim dispersos entre as arteríolas branquiais aferentes da região ventral da faringe (CYR e EALES, 1996; CARR e PATIÑO, 2011). A L-tiroxina ( $T_4$ ) é o principal hormônio tireoidiano secretado sob condições normais, enquanto que o  $T_3$ , a forma ativa do hormônio, é produzida em sua maior parte por tecidos periféricos a partir da conversão do  $T_4$  (Figuras 5 e 6) (BASSET et al., 2003).



**Figura 5.** A. Eixos: hipotalâmico-hipofisário-tireoide, -interrenal e -testicular. A secreção hipofisária do Tsh (hormônio estimulador da tireoide) parece ser dependente do hormônio liberador de corticotropinas (CRH), de modo similar ao observado em anfíbios, répteis e aves. O CRH é o precursor também do hormônio corticotrófico (ACTH), que estimula a síntese e secreção do cortisol pela glândula interrenal. Nos folículos tireoidianos, os quais são dispersos em peixes, o Tsh estimula a secreção do T4. Dois tipos de desidases (DIO1 e DIO2) convertem o T4 em T3 via extra tireoide. T3 é a forma ativa do HT e dentre suas funções no testículo, está associado com o desenvolvimento testicular, crescimento e maturação. Estudos recentes mostraram que o T3 aumentou a função do Fsh e Lh no testículo (seta larga). B. Principais efeitos dos HTs no eixo hipotalâmico-pituitário-testicular. Em mamíferos, os HT inibem a síntese de GnRH (TSUTSUI et al., 2018). Outros estudos mostraram que o GnRH aumenta o nível de Tsh e a função da tireoide em algumas espécies de peixes e anfíbios (JACOBS et al., 1988a,b; ROY et al., 2000; CHIBA et al., 2004). O ponto de interrogação (?) indica os dados controversos na literatura a respeito da relação entre GnRH e tireoide. Retirado de TOVO-NETO et al. (2018).

O metabolismo dos HTs é regulado por três tipos de enzimas iodotironinas deiodinases (tipo I, II e III), como mostra a Figura 2 (DUARTE-GUTERMAN et al.,

2014). A deiodinase tipo I (D1) catalisa a desiodação do anel externo para produzir T3 a partir do T4 e também faz a desiodação no anel interno para produzir o T3 reverso (T3r, inativo) a partir do T4. O tipo II (D2) atua exclusivamente na ativação dos HTs pela catálise da conversão de T4 para T3 (DUARTE-GUTERMAN e TRUDEAU, 2010) (Figura 6). O tipo III (D3) catalisa unicamente a desiodação do anel interno das moléculas de T4 e T3, o que resulta na formação de metabólitos inativos rT3 e T2, respectivamente (MEYER et al., 2007) (Figura 6). A coordenação da expressão e atividade das enzimas desiodases em tecidos individuais regulam a concentração dos HTs ativos, de acordo com as necessidades específicas do tecido (FLOOD et al., 2013).



**Figura 6.** Metabolismo do hormônio tireoideano (T4) a partir das desiodases. O T4 é a principal forma produzida sob circunstância normal. O T4 pode ser tanto metabolizado em T3 (que é a forma ativa dos HTs geralmente) pela ação das DIO1e2; como pode também ser metabolizado em uma forma inativa conhecida como rT3 (reverso) pela ação das DIO1e3. O T3 pode ser metabolizado em T2 pelas DIO1e3, assim como o rT3 pode ser convertido em T2 pela ação das DIO1e2. Retirado de TOVO-NETO et al. (2018).

A forma ativa dos HTs (T3) atua por meio de receptores nucleares (TR, *Thyroid hormone receptor*), que possuem duas isoformas, o TR $\alpha$  e TR $\beta$ . Os receptores nucleares dos HTs são codificados pelos genes *THRA* e *THRB*, os quais são transcritos em múltiplas isoformas de RNAm. As isoformas Tr $\alpha$ 1, Tr $\alpha$ 2, Tr $\beta$ 1 e Tr $\beta$ 3 são expressas amplamente ao passo que a expressão do Tr $\beta$ 2 é restrita ao eixo hipotalâmico-hipofisário, onde atua negativamente regulando a transcrição do TSH em mamíferos (para revisão veja BASSET et al., 2003). Os TRs atuam como fatores de transcrição ligando-se à regiões regulatórias do gene alvo, ativando ou reprimindo sua transcrição (BASSET et al., 2003).

O papel dos HTs na reprodução de peixes (machos) foi recentemente revisto por TOVO-NETO et al. (2018) e não será discutido neste capítulo (veja anexo). TOVO-NETO et al. (2018) reporta dados de que os HTs são importantes em todas as etapas da formação da gônada em peixes, seja na fase de reversão sexual, na fase de desenvolvimento testicular ou na espermatogênese em animais adultos.

### 3. O zebrafish (*D. rerio*) como modelo experimental

O *D. rerio*, originário da Ásia (principalmente Índia), é também conhecido como peixe zebra (zebrafish), paulistinha ou peixe-bandeira, devido às suas listras horizontais que lembram a bandeira do Estado de São Paulo. Este pequeno teleósteo de água doce (~5cm de comprimento) pertence à família Cyprinidae e à ordem Cypriniformes.

Em função de seu fácil manejo, tolerância à altas densidades, reprodução padronizada em laboratório, assim como transparência ótica do desenvolvimento dos embriões, fazem do zebrafish um excelente modelo experimental para pesquisas científicas em vertebrados (MCGONNELL e FOWKES, 2006). Este teleósteo possui vida média em torno de três anos e sua primeira maturação ocorre com três meses de vida. Normalmente, a temperatura de conforto da espécie é em média de 27-28°C. A fêmea desta espécie pode desovar cerca de 100-200 ovos semanalmente.

O sequenciamento recente do genoma do zebrafish, disponibilizado no site ZFIN (The zebrafish Information Network), abriu enormes possibilidades para que

estudos na área de genética sejam desenvolvidos neste teleósteo, propiciando inclusive a geração de excelentes modelos transgênicos na área da biologia da reprodução.

Além da aplicabilidade do zebrafish em pesquisas básicas como no estudo das funções gênicas e da biologia do desenvolvimento, a espécie também é utilizada em pesquisas aplicadas no estudo da base genética de inúmeras doenças em humanos (arritmia cardíaca, doenças neurodegenerativas, endocrinologia, doenças hematológicas, e até mesmo no estudo do câncer) (HEILESEN, 2017). Outro uso importante do zebrafish é na área de toxicologia. Tais características fazem do zebrafish um modelo bem interessante para pesquisa tanto básica quanto aplicada.

### **Objetivo Geral**

Estudar os efeitos do cortisol e hormônios tireoidianos na espermatogênese de zebrafish (*Danio rerio*).

### **Objetivos Específicos**

1. Estudar os efeitos do cortisol na espermatogênese do zebrafish utilizando o sistema *ex vivo* de cultura de explantes.
2. Estudar os efeitos dos hormônios tireoidianos (T3 e T4) na espermatogênese do zebrafish utilizando o sistema *ex vivo* de cultura de explantes.
3. Estudar os efeitos do T3 combinado com a gonadotrofina Fsh na espermatogênese do zebrafish utilizando o sistema *ex vivo* de cultura de explantes.
4. Estudar os efeitos do hipotireoidismo induzido quimicamente pelo metimazol na espermatogênese do zebrafish *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ALURU, N.; VIJAYAN, M.M. 2008. Molecular characterization, tissue specific expression and regulation of melanocortin 2 receptor in rainbow trout. *Endocrinology* 149, 4577–4588.
- ALURU, N.; VIJAYAN, M.M. 2009. Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* 164, 142-150.
- ANDREU-VIEYRA, C.V.; HABIBI, H.R., 2007. Hormonal regulation of follicular atresia in teleost fish, In: BABIN, P.J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. *The Fish Oocyte: From Basics Studies to Biothechnological Applications*. Springer Netherlands, p.235-253.
- BAKER, M.E. 2004. Evolutionary analysis of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-type 1, -type 2, -type3 and 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-type 2 in fish. *FEBS Lett.* 574, 167-170.
- BASSET, J.H.D.; HARVEY, C.B.; WILLIAMS, G.R. 2003. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 213, 1-11.
- BLANTON, M.L.; SPECKER, J.L. 2007. The Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis in Fish and Its Role in Fish Development and Reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 97-115.
- BROWN, D.D.; CAI, L.Q. 2007. Amphibian metamorphosis. *Dev. Biol.* 306, 20-33.
- CAMPBELL, P.M.; POTTINGER, T.G.; SUMPTER, J.P. 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Gen. Bio. Reprod.* 47, 1140-1150.
- CAMPBELL, P.M.; POTTINGER, T.G.; SUMPTER, J.P. 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture* 120, 151-169.
- CARR, J.A.; PATIÑO, R. 2011. The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in teleosts and amphibians: Endocrine disruption and its consequences to natural populations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 299-312.

- CARRAGHER, J.F.; SUMPTER, J.P.; POTTINGER, T.G.; PICKERING, A.D., 1989. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L., & *Salmo gairdneri* Richardson. Gen. Comp. Endocrinol. 76, 310.
- CARRAGHER, J.F.; SUMPTER, J.P. 1990. The effect of cortisol on the secretion of sex steroids from cultured ovarian follicles of rainbow trout. Gen. Comp. Endocrinol. 77, 403.
- CASTAÑEDA CORTÉS, D.C.; LANGLOIS, V.S.; FERNANDINO, J.I. 2014. Crossover of the hypothalamic pituitary-adrenal/interrenal, -thyroid, and –gonadal axes in axes in testicular development. Front. Endocrinol. 139, 1-11.
- CASTRANOVA, D.A.; KING, W.; WOODS, L.C. 2005. The effects of stress on androgen production, spermiation response and sperm quality in high and low cortisol responsive domesticated male striped bass. Aquaculture 246, 413–422.
- CHIBA, H.; AMANO, M.; YAMADA, H.; FUJIMOTO Y.; OJIMA, D.; OKUZAWA, K.; YAMANOME, T.; YAMAMORI, K.; IWATA, M. 2004. Involvement of Gonadotropin-Releasing Hormone in Thyroxine Release in Three different forms of Teleost Fish: Barfin Flounder, Masu Salmon and Goldfish. Fish Physiol. Biochem. 30, 267-273.
- CLEARY, J.J.; PANKHURST, N.W. 2000. The effect of capture and handling stress on plasma steroid levels and gonadal condition in wild and farmed snapper *Pagrus auratus* (Sparidae). J. World Aquacult. Soc. 31, 558–567.
- COLOMBE, L.; FOSTIER, A.; BURY, N.R.; PAKDEL, F.; GUIGUEN, Y. 2000. A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: cloning and characterization of its steroid binding domain. Steroids 65, 319–328.
- CONSTEN, D.; LAMBERT, J.G.D.; GOOS, H.J.Th. 2001. Cortisol affects testicular development in male common carp, *Cyprinus carpio* L., but not via an effect on LH secretion. Comp. Biochem. Physiol. B 129, 671-677.



- CONSTEN, D.; TERLOU, M.; LAMBERT, J.G.D.; GOOS, H.J.Th. 2002. Corticosteroids affect the testicular androgen production in male common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Biol. Reprod.* 66, 106–111.
- CYR, D.G.; EALES, J.G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 6, 165-200.
- De GROEF, B.; GORIS, N.; ARCKENS, L.; KÜHN, E.R.; DARRAS, V.M. 2003. Corticotropin-Releasing Hormone (CRH)-Induced Thyrotropin Release Is Directly Mediated through CRH Receptor Type 2 on Thyrotropes. *Endocrinology* 144, 5537-5544.
- DICKHOFF, W.W.; YAN, L.; PLISETSKAYA, E.M.; SULLIVAN, C.V.; SWANSON, P.; HARA, A.; BERNARD, M.G. 1989. Relationship between metabolic and reproductive hormones in salmonid fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 7, 147-155.
- DUARTE-GUTERMAN, P.; TRUDEAU, V.L. 2010. Regulation of Thyroid Hormone-, Oestrogen- and Androgen- Related Genes by Triiodothyronine in the Brain of *Silurana tropicalis*. *J. Neuroendocrinol.* 22, 1023-1031.
- DUARTE-GUTERMAN, P.; NAVARRO-MARTÍN, L.; TRUDEAU, V.L. 2014. Mechanisms of crosstalk between endocrine system: Regulation of sex steroid hormone synthesis and action by thyroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 203, 69-85.
- DUFOUR, S.; SEBERT, M.E.; WELTZIEN, F.A.; ROUSSEAU, K.; PASQUALINI, C. 2010. Neuroendocrine control by 44 dopamine of teleost reproduction. *J. Fish Biol.* 76, 129-160.
- FERNANDINO, J.I.; HATTORI, R.S.; KISHII, A.; STRÜSSMANN, C.A.; SOMOZA, G.M. 2012. The Cortisol and Androgen Pathways Cross Talk in High Temperature-Induced Masculinization: The 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase as a Key Enzyme. *Endocrinology* 153, 6003-6011.
- FILBY, A.L.; TYLER, C.R. 2007. Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and

- developmental-specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 41, 563–565.
- FLOOD, D.E.K.; FERNANDINO, J.I.; LANGLOIS, V.S. 2013. Thyroid hormones in male reproductive development: Evidence for direct crosstalk between the androgen and thyroid hormone axes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 2-14.
- FOO, J.T.W.; LAM, T.J. 1993. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 115, 145-158.
- FRANÇA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. *A Célula: Uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Ed. Manole, 2005. p.302-324.
- FRANÇA, L.R.; NÓBREGA, R.H.; MORAIS, R.D.V.S.; ASSIS, L.H.C.; SCHULZ, R.W. Sertoli cell structure and function in anamniote vertebrates, in: GRISWOLD, M.D. *Sertoli cell biology*. Amsterdam: Elsevier, 2015. p.385–407.
- GAO, H-B.; TONG, M-H.; HU, Y-Q.; YOU, H-Y.; GUO, Q-S.; GE., R-N.; HARDY, M.P. 2003. Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 199, 153-163.
- GARCÍA-LÓPEZ, A.; BOGERD, J.; GRANNEMAN, J.C.; Van DIJK, W., TRANT, J.M., TARANGER, G.L., SCHULZ, R.W. 2009. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology* 150, 357–365.
- GARCÍA-LÓPEZ, A.; De JONGE, H.; NÓBREGA, R.H.; DE WAAL, P.P.; VAN DIJK, W.; HEMRIKA, W.; TARANGER, G.L.; BOGERD, J.; SCHULZ, R.W., 2010. Studies in Zebrafish Reveal Unusual Cellular Expression Patterns of Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acids in the Testis and Unexpected Functional Differentiation of the Gonadotropins. *Reprod. Dev.* 151, 2349-2360.
- GE, R.S.; DONG, Q.; NIU, E.M.; SOTTAS, C.M.; HARDY, D.O.; CATTERALL, J.F.; LATIF, S.A.; MORRIS, D.J.; HARDY, M.P. 2005. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 in rat Leydig cells: its role in blunting glucocorticoid action at physiological levels of substrate. *Endocrinology* 146, 2657–2664.

- GOIKOETXEA, A.; TODD, E.V.; GEMMELL, N.J. 2017. Stress and sex: does cortisol mediate sex change in fish? *Reproduction* 154, R149-160.
- GOOS, H.J.TH.; CONSTEN, D. 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197, 105-116.
- GREENWOOD, A.K.; BUTLER, P.C.; WHITE, R.B.; DEMARCO, U.; PEARCE, D.; FERNALD, R.D. 2003. Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology* 144, 4226–4236.
- GRIER, H.J. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache River Press, p. 703–739.
- HABIBI, H.R.; NELSON, E.R.; ALLAN, E.R.O. 2012. New insights into thyroid hormone function and modulation of reproduction in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 19-26.
- HADDY, J.A.; PANKHURST, N.W. 1999. Stress-induced changes in concentrations of plasma sex steroids in black bream. *J. Fish Biol.* 55, 1304–1316.
- HATTORI, R.S.; FERNANDINO, J.I.; KISHII, A.; KIMURA, H.; KINNO, T.; OURA, M.; SOMOZA, G.M.; YOKOTA, M.; STRÜSSMANN, C.A.; WATANABE, S. 2009. Cortisol-Induced Masculinization: Does Thermal Stress Affect Gonadal Fate in Pejerrey, A Teleost Fish with Temperature-Dependent Sex Determination? *PLoS One* 4, e6548.
- HEILESEN, E. 2017. The zebrafish is an important animal model. Disponível em <<http://mbg.au.dk/en/news-and-events/news-item/artikel/the-zebrafish-is-an-important-animal-model/>>. Acesso em: jun. 2017.
- HOU, Y.Y.; HAN, X.D.; YUZURI, S. 2001. Annual changes in plasma levels of cortisol and sex steroid hormones in male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chin. J. Ocean. Limnol.* 19, 217–221.

- JACOBS, G.F.M.; GOYVAERTS, M.P.; VANDORPE, G.; QUAGHEBEUR, A.M.L.; KUHN, E.R. 1988a. Luteinizing hormone-releasing hormone as a potent stimulator of the thyroidal axis in ranid frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70, 274-283.
- JACOBS, G.F.M.; MICHELESEN, R.P.; KUHN, E.R. 1988b. Thyroxine and triiodothyronine in plasma and thyroids of the neotenic and metamorphosed axolotl *Ambystoma mexicanum*: influence of TRH injections. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70, 145-151.
- JOSHI, S.N. 1982. Effect of hydrocortisone acetate on the maturity of male *Labeo gonius* (ham.). *Endocrinology* 80, 299-303.
- KOULISH, S.; KRAMER, C.R.; GRIER, H.J. 2002. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J. Morphol.* 254, 292-311.
- LARSEN, D.A.; SWANSON, P.; DICKEY, J.T.; RIVIER, J.; DICKHOFF, W.W. 1998. *In Vitro* Thyrotropin-Releasing Activity of Corticotropin-Releasing Hormone-Family Peptides in Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109, 276-285.
- LEAL, M.C.; De WAAL, P.P.; GARCÍA-LÓPEZ, A.; CHEN, S.X.; BOGERD, J.; SCHULZ, R.W. 2009. Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function ex vivo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 134–138.
- LISTER, A.; NERO, V.; FARWELL, A.; DIXON, D.G.; Van Der KRAAK, G. 2008. Reproductive and stress hormone levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil and sands process-affected water. *Aquat. Toxicol.* 87, 170–177.
- MATTA, S.L.P.; VILELA, D.A.R.; GODINHO, H.P. FRANÇA, L.R., 2002. The Goitrogen 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) Given during Testis Development Increases Sertoli and Germ Cell Numbers per Cyst in Fish: The Tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology* 143, 970-978.
- MCGONNELL, I.M.; FOWKES, R.C. 2006. Fishing for gene function – endocrine modelling in the zebrafish. *J. Endocrinol.* 189, 425-439.

- MEYER, E.L.S.; WAGNER, M.S.; MAIA, A.L. 2007. Expressão das iodotironinas Desiodases nas Neoplasias Tireoidianas. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 51, 690-700.
- MILLA, S.; TERRIEN, X.; STURM, A.; IBRAHIM, F.; GITON, F.; FIET, J., PRUNET, P., LE GAC, F., 2008. Plasma 11-deoxycorticosterone (DOC) and mineralocorticoid receptor testicular expression during rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermiation: implication with 17alpha, 20beta-dihydroxyprogesterone on the milt fluidity? Reprod. Biol. Endocrinol. 6, 19.
- MILLA, S.; WANG, N.; MANDIKI, S.N.M.; KESTEMONT, P. 2009. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? Comp. Biochem. Physiol. Part A. 153, 242-251.
- MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fish. 9, 211-268.
- MYLONAS, C.C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 516-534.
- NACHARAJU, V.L.; MUNEYYIRCI, O.; KAHN, N.; 1997. Presence of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human semen: evidence of correlation with semen characteristics. Steroids 62, 311–314.
- NÓBREGA, R.H.; BATLOUNI, S.R.; FRANÇA, L.R.; 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. Fish. Physiol. Biochem. 35, 197-206.
- OZAKI, Y.; HIGUCHI, M.; MIURA, C.; YAMAGUCHI, S.; TOZAWA, Y.; MIURA, T. 2006. Roles of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Fish Spermatogenesis. Endocrinology 147, 5139-5146.
- PANKHURST, N.W.; VAN DER KRAAK, G.; PETER, R.E. 1995. Evidence that the inhibitory effects of stress on reproduction in teleost fish are not mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 99, 249-257.

- PANKHURST, N.W. Reproduction and Development, In: SCHRECK, C.B.; TORT, L.; FARRELL, A.; BRAUNER, C. Biology of Stress in Fish. Academic Press, 2016. p.295-331.
- PARK, C.B.; TAKEMURA, A.; ALURU, N.; PARK, Y.J.; KIM, B.H.; LEE, C.H.; LEE, Y.D.; MOON, T.W.; VIJAYAN, M.M. 2007. Tissue-specific suppression of estrogen, androgen and glucocorticoid receptor gene expression in feral vitellogenic male Mozambique tilapia. *Chemosphere* 69, 32–40.
- PICKERING, A.D.; CHRISTIE, P. 1981. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44, 488–496.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G.; CARRAGHER, J.; SUMPTER, J.P.; 1987. The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 249–259.
- PIERCE, J.G.; PARSONS, T.F. 1981. Glycoprotein hormones. Structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 465–495.
- POTTINGER, T.G.; BALM, P.H.M.; PICKERING, A.D. 1995. Sexual maturity modifies the responsiveness of the pituitary–interrenal axis to stress in male rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98, 311–320.
- POTTINGER, T.G. The impact of stress on animal reproductive activities. In: BALM, P.H.M. *Stress Physiology in Animals*. Sheffield Academic Press, 1999, p.130–177.
- PUDNEY, J. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: Russell, L.D.; Griswold, M.D. *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press, 1993. p.611–657.
- PUDNEY, J., 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 32, 459–497.
- REID, S.G.; BERNIER, N.J.; PERRY, S.F. 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 120, 1–27.

- RODNICK, K.J.; PLANAS, J.V. The Stress and Stress Mitigation Effects of Exercise: Cardiovascular, Metabolic, and Skeletal Muscle Adjustments. In: SCHRECK, C.B.; TORT, L.; FARRELL, A.P.; BRAUNER, C.J. *Biology of Stress in Fish*. Amsterdam: Elsevier, 2016. p.251-294.
- ROY, P.; DATTA, M.; DASGUPTA, S.; BHATTACHARYA, S. 1990. Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulates Thyroid Activity in a Freshwater Murrel, *Channa gachua* (Ham.), and Carps, *Catla catla* (Ham.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *General and Comparative Endocrinology* 117, 456-463.
- RUSSELL, L.D.; ETHLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press, 1990.
- SCHRECK, C.B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M.S. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197, 3-24.
- SCHRECK, C.B. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. MOBERG, G.P.; MENCH, J. A. Wallingford: CAB International, 2000. p.147–158.
- SCHRECK, C.B.; TORT, L. 2016. The Concept of Stress in Fish. In: SCHRECK, C.B.; TORT, L.; FARREL, A.P.; BRAUNER, C.J. *Fish Physiology*. Amsterdam: Elsevier, p.1-34.
- SCHULZ, R.W.; FRANÇA, L.R.; LAREYE, J.J.; LE GAC F.; CHIARINI-GARCIA H.; NÓBREGA R.H.; MIURA, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390-411.
- SCHULZ, R.W.; VISCHER, H.; CAVACO, J.E.B.; SANTOS, E.M.; TYLER, C.R.; GOOS, H.J.Th.; BOGERD, J. 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 407-417.
- SCOTT, A.P.; BAYNES, S.M. 1982. Plasma levels of sex steroids in relation to ovulation and spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In: RICHTER, C.J.J., GOOS, H.J. *Proceedings of the 2nd International Symposium on*

- Reproductive Physiology of Fish: 2–6 august 1982. Pudoc, Wageningen, p. 103–106.
- SELYE, H., 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *Br. Med. J.* 1, 1383–1392.
- SHAHJAHAN, M.; KITAHASHI, T.; OGAWA, S.; PARHAR, I.S. 2013. Temperature differentially regulates the two kisspeptin systems in the brain of zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 193, 79-85.
- SHANKAR, D.S.; KULKARNI, R.S. 2000. Effect of cortisol on testis of freshwater fish *Notopterus notopterus* (Pallas). *Indian J. Exp. Biol.* 38, 1227-1230.
- SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis, In: KNOBIL E.; NEILL, J.D. 1994. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. p.1363-1434.
- SOWER, S.A.; FREMAT, M.; KAVANAUGH, S.I. 2009. The origins of the vertebrate hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) and hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) endocrine systems: New insights from lampreys. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 20-29.
- STURM, A.; BURY, N.; DENGREVILLE, L.; FAGART, J.; FLOURIOT, G.; RAFESTIN-OBLIN, M.E.; PRUNET, P. 2005. 11-Deoxycorticosterone is a potent agonist of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 146, 47–55.
- TAKEI, Y.; HWANG, P-P. 2016. Homeostatic Responses to Osmotic Stress. In: SCHRECK, C.B; TORT, L.; FARRELL, A.P.; BRAUNER, C.J. *Biology of Stress in Fish*. Elsevier. p.207-249.
- TOVO-NETO, A.; RODRIGUES, M.S.; HABIBI, H.R.; NÓBREGA, R.H. 2018. Thyroid hormones action on male reproductive system of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* In press.
- TSUTSUI, K.; SON, Y.S.; KIYOHARA, M.; MIYATA, I. 2018. Discovery of GnIH and Its Role in Hypothyroidism-Induced Delayed Puberty. *Endocrinology* 159, 62-68.



- VILELA, D.A.R.; SILVA, S.G.B.; PEIXOTO, M.T.D.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. 2003. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 187-190.
- WAGNER, A.; CLAUS, R. 2004. Involvement of glucocorticoids in testicular involution after active immunization of boars against GnRH. *Reproduction* 127, 275–283.
- WENDELAAR BONGA, S.E, 1997. The stress response in fish. *Physiol. Revs.* 77, 591–625.
- WEBER, M.A.; GROOS, S.; HÖPFL, U.; SPIELMANN, M.; AUMÜLLER, G.; KONRAD, L. 2000. Glucocorticoid receptor distribution in rat testis during postnatal development and effects of dexamethasone on immature peritubular cells *in vitro*. *Andrologia* 32, 23-30.
- YAMAGUCHI, T.; YOSHINAGA, N.; YAZAWA, T.; GEN, K.; KITANO T. 2010. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology* 151, 3900-3908.
- ZOHAR, Y.; MUÑOZ-CUETO, J.A.; ELIZUR, A.; KAH, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 438-455.

## **General Conclusion**

The role of cortisol and THs in zebrafish spermatogenesis was investigated through *in vitro* and *in vivo* studies. It has been clear that cortisol has a positive role in zebrafish spermatogenesis by stimulating germ cells differentiation and increased the number of free spermatozoa in the lumen, in an androgen independent manner.

Regarding the THs, *in vitro* studies showed that T3 affected germ cells related genes, while T4 did not alter any gene evaluated. Moreover, *in vivo* studies showed that methimazole increased the area occupied by the type A undifferentiated spermatogonia and type B spermatogonia, while spermatozoa and the lumen area were reduced significantly, which suggests that hypothyroidism-induced impairs meiosis, and modulates the mRNA expression of Sertoli and Leydig cells genes.