

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITOS DA AÇÃO DE COMPOSTOS
NATURAIS NA INVERSÃO SEXUAL DE**
Danio rerio **DURANTE SUA**
DIFERENCIAÇÃO GONADAL

Graziele Cristine da Silva

Jaboticabal – São Paulo

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITOS DA AÇÃO DE COMPOSTOS
NATURAIS NA INVERSÃO SEXUAL DE**
Danio rerio **DURANTE SUA**
DIFERENCIAÇÃO GONADAL

Graziele Cristine da Silva

Orientador: Prof^a. Dr^a. Talita Sarah Mazzoni

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Aquicultura do
Centro de Aquicultura da UNESP -
CAUNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal – São Paulo

2022

S586e	Silva, Grazielle Cristine da Efeitos da ação de compostos naturais na inversão sexual Danio rerio durante sua diferenciação gonadal / Grazielle Cristine da Silva. -- Jaboticabal, 2022 65 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Talita Sarah Mazzoni 1. Hermafroditismo. 2. Metaloproteinases da Matriz. 3. Zebrafish. 4. Morfogênese. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

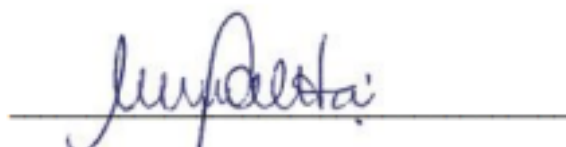
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITOS DA AÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NA INVERSÃO SEXUAL DE *Danio rerio* DURANTE SUA DIFERENCIAÇÃO GONADAL

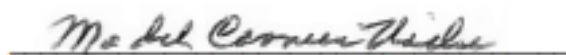
AUTORA: GRAZIELE CRISTINE DA SILVA

ORIENTADORA: TALITA SARAH MAZZONI

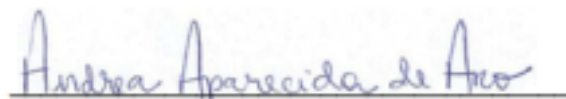
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Talita Sarah Mazzoni (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG



Profa. Dra. Mari Carmen Uribe Aranzabal (Participação Virtual)
Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México



Profa. Dra. Andrea Aparecida de Aro (Participação Virtual)
Sociedade Beneficente Israelita Albert Einstein – São Paulo

Jaboticabal, 28 de abril de 2022

Sumário

DEDICATÓRIAS	vii
AGRADECIMENTOS	x
APOIO FINANCEIRO	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Biologia Reprodutiva dos Peixes Teleostei	5
2.2. Estrutura Gonadal	6
2.3. Diferenciação e Desenvolvimento Gonadal.....	7
2.4. Matriz Extracelular e Remodelação Gonadal	8
2.5. Os Compostos Naturais e suas Propriedades.....	10
2.5.1. <i>Camellia sinensis</i>	11
2.5.2. <i>Bauhinia</i> sp.	11
2.5.3. Tintura de Vegetais	12
2.6. O Modelo Experimental	12
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	15
5. RESULTADOS	20
5.1. A Morfogênese Gonadal durante o Hermafroditismo Juvenil	20
5.1.1. O Primórdio Gonadal.....	20
5.1.2. A Gônada Indiferenciada.....	20
5.2. Diferenciação Gonadal durante o Hermafroditismo Juvenil.....	21
5.2.1. Diferenciação Ovariana	22
5.2.1.1. Foliculogênese	22
5.2.1.2. Formação das Lamelas Ovíferas e o Epitélio Germinativo.....	27
5.2.2. Diferenciação Testicular	31
5.3. O Compartimento Intersticial e o Compartimento Germinativo	36
5.4. Detecção de Proteínas por Imunohistoquímica durante a Remodelação Gonadal.....	39
5.4.1. Detecção das Metaloproteinases de Matriz MMP-9, MMP-2 e MMP-14	39
5.5. Zimografia <i>in situ</i>	41
5.6. Variação do pH.....	44
5.7. Histologia Hepática	45
6. DISCUSSÃO.....	46

6.1. Remodelação Gonadal.....	46
6.2. Expressão das Metaloproteinases durante a Inversão Sexual	47
6.3. Ação dos Compostos Naturais durante a Remodelação Gonadal.....	50
6.4. Toxicidade Compostos Naturais.....	52
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO I.....	66

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Amarildo Candido e Luzia Aparecida

Não tenho palavras suficientes para expressar a minha gratidão pelo amor incondicional, carinho e dedicação que sempre me deram. Vocês se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional, e principalmente pessoal. Eu devo tudo que sou a vocês, e se sinto orgulho de mim e do lugar onde cheguei, é porque sei que vocês vieram segurando a minha mão em cada passo dado. Agradeço pela vida que me deram, e por serem os melhores pais do mundo. Eu dedico este título à vocês. Obrigada meu pai e minha mãe! Eu amo vocês!

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um facto inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”

- Bertrand Russell

Às minhas irmãs, Gislayne Figueiredo e Gisely Figueiredo

Ser irmã caçula é conhecer a proteção e amor que jamais poderá ser explicado. A distância sempre foi um obstáculo em nossa caminhada, mas nunca impediu que pudéssemos estar conectadas. Muitas vezes posso ser teimosa e mimada, brigar e discutir, mas o sangue que nos une é tão real como a amizade que nos aproxima. Tive a sorte de ganhar duas amigas, ao mesmo tempo que ganhei duas irmãs, e disso jamais abrirei mão. As palavras são poucas para agradecer por tudo o que vocês tem feito em minha vida, por todos os conselhos, abraços e carinhos, por todas as palavras de consolo, pelas vezes que você me fizeram sorrir, me defenderam, me protegeram e não desistiram de mim. Depois de muitas despedidas, choros, horas de viagem e tristeza, hoje poderemos comemorar mais uma conquista que sem vocês não possível.

Que o Senhor nos conceda muitos anos de fraternidade, e que todos os dias abençoe-nos com muita saúde e felicidade. Obrigada por serem meu porto seguro! Amo vocês.

“Vocês podem ser tão diferentes como o sol e a lua, mas o mesmo sangue flui através do coração de ambas. Você precisa dela assim como ela precisa de você!”

- George R. R. Martin

Seis anos se passaram e aqui estamos nós diante de mais uma conquista. Em diversas vezes me pego pensando o que passei em minha trajetória até aqui e fico sem acreditar que tudo isso foi possível. Você é um exemplo de profissional e se eu cheguei até aqui é simplesmente por você ser quem você é! Não é a toa que os alunos e companheiros de profissão te admiram. Foram muitas lágrimas, muito estresse, muitas viagens, muitas aulas, muitas noites em claro, mas também muitas risadas.

Desde o início eu sempre vi você incentivar e apoiar todos os seus alunos, os merecedores e os menos merecedores. Muitos tiveram a oportunidade de trabalhar com você, mas não tiveram a sorte de compreender o quanto aquilo seria enriquecedor, profissionalmente e pessoalmente. A cada dia você consegue me surpreender ainda mais com o tamanho do seu coração (mas por favor, pare de oferecer carona para desconhecidos).

O tempo nos trouxe não só o companheirismo, mas a amizade também. E quando abrimos mão de nossa cidade de origem para estudar, é preciso construir ligações com pessoas que possam segurar nossa mão em dias difíceis e nublados. E você foi essa pessoa. Jamais se esqueça que você é uma pessoa muito especial e pessoas especiais brilham em nossas vidas como estrelas no céu.

Obrigada professora amiga Talita por toda paciência e dedicação que você teve comigo. Espero que em um futuro próximo mais conquistas possam vir.

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais...”

- Rubem Alves

“Todo profissional é prosa. Só o professor é poesia.”

- Leonardo L. Bcena

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Deus por todas as coisas boas e ruins que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou. Foi uma longa jornada de tropeços, vitórias e derrotas, que me fez enxergar o verdadeiro significado e beleza da vida.

Hoje sou uma pessoa melhor, mais compreensiva e forte graças aos seus ensinamentos. Hoje tenho maturidade para me reconciliar com os meus erros e defeitos, e discernimento para entender as linhas que o Senhor traçou para a minha vida. Peço que continue a me abençoar e a me proteger com as tuas mãos poderosas, e agradeço por confiar a mim o dom da vida e me comprometo a buscar a paz, a bondade e a felicidade!

Em segundo lugar gostar de agradecer à todas as pessoas que direta e indiretamente me ajudaram e estavam presentes ao longo de minha jornada:

- Às minhas amigas Ana Laura e Isabela Dias, pela amizade sincera, por me incentivarem e por nunca soltarem a minha mão, mesmo estando longe. Obrigada por estarem comigo e saibam que estarei sempre com vocês em todos os momentos;

- À meu amigo Gustavo Junqueira, que desde 2014 sempre me abraçou com palavras, esteve ao meu lado e me fez ter confiança nas minhas decisões mesmo estando longe;

- Às amigas da pós-graduação, Carol Giroto Presseti e Júlia L. Moreira Nacif, pelo companheirismo e amizade que construímos em meio ao caos, e que em muitas noites foram confidentes se mostrando amigas especiais mesmo nos momentos difíceis;

- Ao meus colegas pertencentes ao grupo de pesquisa Biologia da Reprodução de Peixes e Organismos Aquáticos - BIOREPOAQUA, pela oportunidade do convívio e pela cooperação mútua durante estes anos, no qual foi possível a realização deste e de muitos outros projetos;

- À Professora Irani Quagio-Grassiotto, por me receber e permitir que eu pudesse participar das pesquisas em andamento no seu laboratório. Obrigada por todo o apoio oferecido indiretamente e saiba que sou eternamente grata por todo o seu suporte;
- Ao Professor Rafael Henrique Nóbrega, da Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita – UNESP, que como parceiro científico de longa data de minha orientadora, inicialmente aceitou me orientar neste programa;
- Ao Laboratório de Biologia Animal Integrativa – LABAInt, e a técnica Juliana Ramos Martins, pela colaboração e pelas aulas sobre como cuidar dos equipamentos, fazer reagentes e experimentos, no qual foram ensinamentos extremamente valiosos;
- Às professoras Dr^a. Marisa Ionta e Dr^a Márcia C. Bizinotto de Assunção do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG, que sempre estavam dispostas a me ajudar e aconselhar ao longo da pesquisa. As suas valiosas indicações, pessoais e profissionais fizeram toda a diferença em minha trajetória;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura – CAUNESP, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, possibilitando a realização desse trabalho.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Bolsa de Mestrado, Processo nº 88887.486423/2020-00 e auxílio da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Nº de Processo 15/16358-7.

RESUMO

Os Teleostei apresentam grande plasticidade frente à expressão sexual e em muitas espécies a condição de hermafroditismo é frequente. Durante a diferenciação gonadal, a gônada sofre uma série de alterações em seu epitélio germinativo. Entretanto, até o presente momento, há poucas informações sobre as alterações que podem ocorrer também no compartimento intersticial. Frente à ausência de informações sobre o papel desempenhado pelas metaloproteinases (MMPs) na remodelação gonadal dos peixes, o presente trabalho avaliou a ação das MMPs durante a diferenciação gonadal de *Danio rerio* (zebrafish), bem como o uso de compostos naturais (*Camellia sinensis* e *Bauhinia* sp.) como possíveis inibidores das MMPs. Durante o hermafroditismo juvenil de zebrafish, observou-se uma intensa remodelação da matriz extracelular na inversão sexual dos juvenis e 3 tipos de MMPs foram detectadas: MMP-9 (em cistos germinativos), MMP-2 (em células em apoptose) e MMP-14 (em poucas células germinativas e células somáticas ao redor dos cistos). Concomitantemente, a membrana basal nos tecidos supostamente masculinos estava ausente. Juvenis expostos a altas doses de *Camellia* e *Bauhinia* apresentaram uma diminuição significativa de MMPs, levando à uma desorganização tecidual da gônada e inibição da remodelação gonadal. Como consequência, o tecido gonadal feminino foi detectado em um maior número de indivíduos nos grupos experimentais, aumentando significativamente a porcentagem de fêmeas de cada grupo. Os compostos naturais possivelmente atuaram como inibidores de MMPs e influenciaram de forma efetiva e duradoura a determinação fenotípica do sexo de *Danio rerio*. Uma vez que a inversão sexual foi definitiva, estudos com compostos naturais podem ser promissores para o desenvolvimento de novas técnicas visando o controle reprodutivo e obtenção de monossexos nas pisciculturas.

Palavras-chave: hermafroditismo, inversão sexual, inibidores de metaloproteinases, zebrafish, morfogênese gonadal.

ABSTRACT

Teleostei show great plasticity in terms of sexual expression and in many species the condition of hermaphroditism is frequent. During gonadal differentiation, the gonad undergoes a series of changes in its germinal epithelium. However, until this moment, there is little information on the changes that may also occur in the interstitial compartment. In view of the lack of information on the role played by the metalloproteinases (MMPs) in fish gonadal remodeling, the present study evaluated the action of MMPs during the gonadal differentiation of *Danio rerio* (zebrafish), as well as the use of natural compounds (*Camellia sinensis* and *Bauhinia* sp.) as possible inhibitors of MMPs. During the juvenile hermaphroditism of *zebrafish*, an intense remodeling of the extracellular matrix was observed in the sexual inversion of juveniles and 3 types of MMPs were detected: MMP-9 (in germline cysts), MMP-2 (in apoptotic cells) and MMP-14 (in a few germ and somatic cells around the cysts). Concomitantly, the basement membrane in the supposedly male tissues was absent. Juveniles exposed to high doses of *Camellia* and *Bauhinia* showed a significant decrease in MMPs, leading to gonad tissue disorganization and inhibition of gonadal remodeling. As a consequence, female gonadal tissue was detected in a greater number of individuals in the experimental groups, significantly increasing the percentage of females in each group. The natural compounds possibly acted as inhibitors of MMPs and effectively and lastingly influenced the phenotypic sex determination of *Danio rerio*. Once the sex inversion was definitive, studies with natural compounds may be promising for the development of new techniques aiming at reproductive control and obtaining monosex in fish farms.

Keywords: hermaphroditism, sex inversion, metalloproteinase inhibitors, *zebrafish*, gonadal morphogenesis.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes Teleostei apresentam grande plasticidade frente à expressão sexual e estratégias reprodutivas (Nagahama, 1983; Vazzoler, 1996; Nakatani et al., 2001) e ainda que a maioria das espécies seja predominantemente dioica ou gonocórica (Nagahama, 1983), algumas famílias de diferentes ordens apresentam a condição de hermafroditismo (Hoar, 1969; Le Gac e Loir, 1999; Lo Nostro, 2000; De Mitcheson e Liu, 2008).

Em algumas espécies, esse tipo de hermafroditismo pode se dar apenas durante a diferenciação gonadal do espécime, sendo classificado como hermafroditismo juvenil (Takahashi, 1977). O Cypriniformes *Danio rerio* é bastante conhecido por apresentar este tipo de diferenciação gonadal (Takahashi, 1977), na qual todos os indivíduos, independente do sexo genotípico, diferenciam-se como fêmeas e, posteriormente, antes do término do processo de estabelecimento da gônada, metade da população sofre uma inversão sexual e se tornam machos (Uchida et al., 2002).

Essa inversão do tecido gonadal nos peixes, seja em animais em diferenciação (Mazzoni et al., 2015) ou mesmo durante ciclos sexuais de adultos (Mazzoni et al., 2018), demanda a ação de diversas moléculas e processos biológicos. Sabe-se que as metaloproteinases de matriz (MMPs) estão envolvidas durante essa remodelação do tecido gonadal ao longo do ciclo reprodutivo, tanto em animais dioicos (Santana e Quagio-Grassiotto, 2014), quanto em hermafroditas (Mazzoni et al., 2018).

As MMPs, enzimas sintetizadas por vários tipos celulares e bastante conhecidas nos mamíferos, promovem a degradação da matriz extracelular e estão envolvidas em diversos processos biológicos como o desenvolvimento embrionário, implantação do blastocisto, morfogênese dos órgãos, desenvolvimento dos sistemas, ovulação, remodelação teciduais, entre outros (Lu et al., 2011 para revisão). A atividade das MMPs é regulada endogenamente pela presença de inibidores teciduais, conhecidos como TIMPs (Tissue Inhibitors of Metaloproteinases) que mantêm o equilíbrio entre a degradação e a síntese do tecido conjuntivo, controlando assim a integridade da matriz extracelular (Khokha et al., 2013). Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são expressos por uma variedade de tipos celulares e estão presentes na maioria dos tecidos e fluidos corporais (Brew et al., 2000; Lambert et al., 2004; Visse e

Nagase, 2003).

Muitas espécies de vegetais possuem substâncias, como compostos fenólicos (Croft, 1998), com a capacidade de mimetizar os TIMPs e consequentemente influenciar uma série de atividades biológicas (Schmitz et al., 2005). Os compostos fenólicos englobam uma gama enorme de substâncias, entre elas os ácidos fenólicos, os quais, por sua constituição química, possuem propriedades antioxidantes (Prado, 2009). Estes compostos apresentam, em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas (Hernández; Prieto Gonzáles, 1999), e dividem-se em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos). Os flavonoides compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais (Graham, 1992; Van Acker, 1996).

Dentre as variedades de espécies de vegetais existentes, *Camellia sinensis* (chá verde) e *Bauhinia* sp. (pata-de-vaca) são conhecidas por apresentarem esses compostos fenólicos (Salatino et al., 1999; Neto, 2008; Vuong et al., 2010) e suas folhas e galhos são, eventualmente, utilizadas como decoração ornamental em aquários ou mesmo para acidificação da água, na tentativa, muitas vezes, de induzir a desova de peixes ornamentais. Entretanto, uma vez que estes compostos podem agir como TIMPs, a diferenciação gonadal dos peixes poderia ser afetada, considerando que as MMPs podem estar presentes no processo de morfogênese gonadal, especialmente em espécies que apresentem diferenciação gonadal indireta, ou seja, condição de hermafroditismo juvenil. Em vista disto, o presente trabalho avaliou a influência de compostos naturais extraídos de folhas e troncos de *Camellia sinensis* e *Bauhinia* sp. durante a remodelação gonadal de *Danio rerio* ao longo sua diferenciação gonadal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biologia Reprodutiva dos Peixes Teleostei

Dentre os vertebrados, os Teleostei são os que apresentam maior plasticidade em relação à expressão sexual e estratégias reprodutivas (Nagahama, 1983; Vazzoler, 1996; Nakatani et al., 2001). A maioria dos Teleostei é predominantemente dioica ou gonocórica, ou seja, apresenta indivíduos de uma mesma espécie com sexos separados (Nagahama, 1983). Porém, o hermafroditismo também pode estar presente entre os Teleostei, sendo frequente em algumas famílias, como por exemplo, em Serranidae e Synbranchidae (Hoar, 1969; Le Gac e Loir, 1999; Lo Nostro, 2000; De Mitcheson e Liu, 2008).

Define-se como hermafroditismo funcional, a condição na qual parte representativa de indivíduos dentro de uma população atua como indivíduos sexualmente maduros, cada qual com ambos os sexos funcionais em algum período de sua vida (Sadovy e Shapiro, 1987; Wu et al., 2010). Em animais sexualmente maduros, o hermafroditismo pode ocorrer de forma simultânea (sincrônica) ou sequencial (Yamamoto, 1969; Sadovy e Shapiro, 1987; Helfman et al., 1997).

Enquanto o hermafroditismo simultâneo, no qual ambos os sexos são concomitantemente funcionais em um mesmo indivíduo, é característico de espécies marinhas, especialmente aquelas que habitam recifes de coral, o hermafroditismo sequencial é amplamente difundido entre os Teleostei (Reinboth, 1988) e caracteriza uma das mais marcantes expressões de plasticidade no desenvolvimento sexual, bem como parte de uma estratégia reprodutiva bem sucedida (Devlin e Nagahama, 2002).

Há dois tipos de hermafroditismo sequencial: 1) protândrico: no qual os indivíduos inicialmente masculinos mudam de sexo, tornando-se fêmeas na vida adulta; 2) protogínico: no qual os indivíduos inicialmente femininos mudam de sexo, tornando-se machos na vida adulta (Devlin e Nagahama, 2002). O hermafroditismo sequencial pode ser encontrado tanto em espécies dulcícolas (Antoneli, 2006 para revisão) como em espécies marinhas. Dentre estas últimas, as mais conhecidas pertencem à família das garoupas (Liu e De Mitcheson, 2009), badejos (Heemstra e Randall, 1993) e os peixes conhecidos como peixes-palhaço (Madhu et al., 2010 para revisão).

Além deste tipo de hermafroditismo, estabelecido em animais sexualmente maduros, um fenômeno semelhante ocorre durante a diferenciação gonadal de algumas espécies de Teleostei, sendo a mais conhecida delas o Cypriniformes *Danio rerio* (Takahashi, 1977). Ao longo do processo de morfogênese gonadal, todos os indivíduos desta espécie desenvolvem gônadas femininas, as quais, subsequentemente degeneram em 50% da população, sendo substituídas por um tecido testicular em crescente desenvolvimento (Takahashi, 1977). Este processo é denominado de hermafroditismo juvenil e pode ser observado em outras espécies de Teleostei tanto dulcícolas (Takahashi e Shimizu, 1983; Strüssmann et al., 1996; Mazzoni et al., 2015) quanto marinhas (Liu e De Mitcheson, 2009; Miura et al., 2003), caracterizando um desenvolvimento gonadal do tipo indireto (espécies gonocorísticas indiferenciadas) (Yamamoto, 1969).

Apesar do controle genético ser um dos principais determinantes do sexo, a determinação sexual em peixes é resultado de uma complexa rede entre diferentes genes específicos (Nishimura et al., 2015) associados a fatores externos, determinando o sexo fisiológico dos peixes (Strüssmann et al., 1996; Cesar et al., 2005). Dessa forma, a determinação sexual e a diferenciação gonadal, bem como a inversão ou reversão do sexo, são controladas tanto por fatores genéticos, como também fisiológicos, comportamentais (Baroiller e D'Cotta, 2001; Devlin e Nagahama, 2002) e ambientais (Strüssmann et al., 1996; Cesar et al., 2005).

2.2. Estrutura Gonadal

A organização básica das gônadas é comum a todos os Teleostei, e apresenta-se dividida em dois compartimentos: o compartimento intersticial e o compartimento germinativo, ambos separados por uma membrana basal, na qual o epitélio germinativo encontra-se apoiado (Grier et al., 2009; Grier e Uribe-Aranzabal, 2009; Quagio-Grassiotto et al., 2011).

Os ovários dos Teleostei, em sua maioria, são órgãos pares e cavitários com o compartimento germinativo em forma de lamelas que se projetam a partir da cápsula em direção à luz do órgão (Nagahama, 1983). Já os testículos, também órgãos pares, podem variar de simples bolsas alongadas a órgãos foliáceos com função espermatogênica e/ou secretora (Burns et al., 1995). O

epitélio germinativo masculino, que recobre os túbulos ou lóbulos testiculares, organiza-se em cistos formados por grupos de células germinativas em desenvolvimento sincrônico, envoltas pelas células de Sertoli (Grier, 1981).

2.3. Diferenciação e Desenvolvimento Gonadal

Apesar da diferenciação gonadal nos Teleostei ter sido alvo de vários estudos nas últimas décadas, especialmente em espécies de água doce (Nakamura et al., 1998; Devlin e Nagahama, 2002), estes se concentram na diferenciação gonadal como um todo, não se preocupando com detalhes da formação de estruturas gonadais cruciais para um entendimento mais completo do processo de diferenciação gonadal. Somente na última década, descrições histológicas mais detalhadas sobre estes processos foram estudadas, especialmente no que se refere à formação do epitélio germinativo (Mazzoni et al., 2010; Mazzoni, 2013; Meijide et al., 2016; Mazzoni et al., 2014, 2015; Valentin et al., 2016; Mazzoni e Quagio-Grassiotto, 2017).

Sabe-se que durante o desenvolvimento gonadal, seja em animais juvenis ou sexualmente maduros, há proliferação do epitélio germinativo (Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2002; Nakamura et al., 2010; Quagio-Grassiotto et al., 2011), diferenciação das células que o compõem (Nakamura et al., 2008; Lubzens et al., 2010; Mazzoni et al., 2010; Quagio-Grassiotto et al., 2011; Mazzoni, 2013), mudanças estruturais da gônada e alterações morfológicas das células, preparando o animal para o período de maturação e liberação dos gametas (Mylonas e Zohar, 2001). Estes estudos enfatizam principalmente as alterações ocorridas no epitélio germinativo. Entretanto, mudanças significativas ocorrem também no compartimento intersticial ou estromal, tanto durante o ciclo reprodutivo (Santana e Quagio-Grassiotto, 2014; Mazzoni et al., 2018), como durante a diferenciação gonadal (Mazzoni et al., 2015).

O compartimento intersticial é constituído especialmente por elementos de tecido conjuntivo, como fibroblastos e células sanguíneas, além de células mesenquimais, mióides, esteroidogênicas, vasos sanguíneos, nervos e uma grande quantidade de matriz extracelular (Cauty e Loir, 1995; Loir et al., 1995; Pudney, 1996; Schulz et al., 2010; Grier, 2012). Assim, as mudanças ocorridas no compartimento intersticial dos peixes merecem ser investigadas mais detalhadamente durante a inversão sexual, uma vez que, quando associadas às

alterações do epitélio germinativo, tornam-se as principais responsáveis pelas modificações morfo-funcionais observadas no tecido gonadal, que se encontra em constante desenvolvimento (Hulboy et al., 1997; Mazzoni et al., 2018).

2.4. Matriz Extracelular e Remodelação Gonadal

Em todos os vertebrados, os órgãos reprodutivos sofrem drásticas alterações em suas propriedades estruturais e funcionais ao longo da vida. Essas mudanças, as quais são orquestradas pelos hormônios e frequentemente mediadas por fatores de crescimento, envolvem uma extensa remodelação do tecido conjuntivo (Hulboy et al., 1997).

A matriz extracelular, uma vez constituída por moléculas de diferentes naturezas, as quais são produzidas, exportadas e complexadas pelas células, permite a modulação da estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos (Lu et al., 2011 para revisão). Dessa forma, acaba por desempenhar um papel dinâmico em processos metabólicos, influenciando mecanismos celulares de proliferação, diferenciação e apoptose (Hulboy et al., 1997; Page-McCaw et al., 2007; Lu et al., 2011). Dentre os componentes mais abundantes da matriz extracelular animal, está o colágeno. O colágeno confere resistência mecânica aos tecidos e pode estar envolvido, direta e indiretamente, na adesão e diferenciação celular, quimiotaxia e, por meio de proteínas de adesão, podem transmitir informações às células sobre alterações físicas e químicas que ocorrem no meio extracelular (Lu et al., 2011 para revisão; Carvalho e Recco-Pimentel, 2013).

Durante o desenvolvimento gonadal dos Teleostei, uma constante remodelação do tecido intersticial é requerida, de acordo com as mudanças sofridas pelo epitélio germinativo, seja ao longo de ciclos reprodutivos (Santana e Quagio-Grassiotto, 2014), ou durante a diferenciação gonadal (Mazzoni et al., 2015). Essa remodelação do tecido conjuntivo requer eventos de degradação e nova síntese dos componentes da matriz extracelular (Hulboy et al., 1997; Lu et al., 2011). A degradação dos componentes da matriz é efetuada por diversas enzimas proteolíticas, porém acredita-se que as metaloproteinases de matriz (MMPs) são as principais envolvidas neste processo (Hulboy et al., 1997; Page-McCaw et al., 2007; Khokha et al., 2013).

As MMPs são um grupo de proteínas estruturalmente relacionadas (endopeptidases), dependentes de cálcio e zinco e ativas a pH fisiológico

(Birkedal-Hansen et al., 1993; Powell e Matrisian, 1996; Page-McCaw et al., 2007). Estas enzimas atuam na degradação de uma grande variedade de componentes da matriz extracelular durante a remodelação tecidual, podendo estar envolvidas na regulação da sinalização célula-célula e célula-matriz (Page-McCaw et al., 2007; Martins et al., 2013).

Além das MMPs, as células também secretam proteínas inibitórias da atividade das MMPs, conhecidas como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Khokha et al., 2013). Os TIMPs são expressos durante a remodelação tecidual contribuindo para manter o equilíbrio metabólico e estrutural da matriz. Dessa forma, em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a razão de MMPs e TIMPs (Woessner, 1991).

Em mamíferos, duas principais metaloproteinases (MMP-9 e MMP-2) foram descritas como reguladoras de alguns dos eventos envolvidos durante o processo de remodelação do epitélio germinativo masculino (Longin et al., 2001). Já nos ovários, a presença da MT-MMP1 (proteína transmembrana) e MMP-2 podem estar relacionadas ao rompimento da parede do folículo (Häggglund et al., 1999).

Em Teleostei, as MMPs têm sido crescente alvo de estudos nos últimos anos, especialmente durante a fase embrionária (Mazzoni e Quagio-Grassiotto, 2021), na qual estas enzimas desempenham papel fundamental na remodelação de tecidos durante o período de morfogênese e de desenvolvimento dos mais diversos sistemas do organismo, atuando em processos de migração, proliferação e diferenciação celular (Zhang et al., 2003a, 2003b, 2003c; Crawford e Pilgrim, 2005; Keow et al., 2011; Janssens et al., 2013; Mazzoni e Quagio-Grassiotto, 2021). Contudo, em aspectos tangentes à biologia reprodutiva, raros são os estudos que relacionam a remodelação gonadal à ação das MMPs, e ainda assim, nenhum deles mostra a ação dessas enzimas durante a diferenciação gonadal.

Os estudos em Teleostei restringem-se a poucas espécies e mostram a ação das MMPs em fases específicas do ciclo reprodutivo masculino (Chaves-Pozo et al., 2003, 2005, 2008; Santana e Quagio-Grassiotto, 2014) e nos processos de maturação oocitária, ovocitação e regressão folicular (Kimura et al., 2001; Ogiwara et al., 2005; Thomé et al., 2010). Recentemente, Mazzoni e colaboradores (2018) mostraram a ação das MMPs na inversão sexual de

adultos da enguia *Synbranchus marmoratus*. Porém, estudos sobre o papel das MMPs durante o hermafroditismo juvenil nos Teleostei são desconhecidos.

2.5. Os Compostos Naturais e suas Propriedades

Na aquariofilia é comum o uso de substâncias naturais como folhas ou troncos de árvore com o objetivo de acidificar o meio para induzir desovas, aclimatar determinadas espécies ou simplesmente enfeitar o ambiente. Entretanto, algumas destas espécies vegetais, como a *Camellia sinensis* (chá verde) e a *Bauhinia* sp. (pata-de-vaca) comumente utilizada na forma de galhos em aquários, apresentam propriedades que mimetizam os TIMPs (Ribeiro et al., 2010; Dos Santos, 2013). Tais propriedades se devem a diferentes compostos que esses vegetais apresentam como, por exemplo, os flavonoides.

Os flavonoides são compostos fenólicos presentes em diversos grupos do reino vegetal, e geralmente são encontrados em folhas, flores, raízes e frutos das plantas (Cowan, 1999), que desempenham funções importantes, dentre elas destacam-se a proteção da radiação UV, a proteção contra microrganismos, ação antioxidante, inibição enzimática, entre outras (Nijveldt et al., 2001). Possuem uma estrutura química básica composta por um núcleo, o qual é constituído por três anéis fenólicos (Tapas et al., 2008) e dependendo do número, lugar e combinação dos grupamentos participantes da molécula, os flavonoides podem ser classificados em: antocianinas, flavonas, flavonóis, auronas, cauconas, isoflavonas, flavononas, catequinas e di-hidroflavonóis.

As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que podem variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (Birt et al., 2001).

Os flavonoides pertencem a uma ampla classe de substâncias químicas de origem natural, cuja síntese não ocorre em seres humanos, mas estudos revelam que os flavonoides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório e antiplaquetário (Pelzer et al., 1998).

2.5.1. *Camellia sinensis*

As propriedades medicinais dos chás têm sido estudadas desde o início dos tempos, por causa das substâncias presentes que agem na proteção do organismo e auxiliam no combate aos radicais livres, responsáveis pelo envelhecimento celular precoce (Matsubara e Rodriguez, 2006). Dentre os chás mais consumidos ao redor do mundo, temos o chá verde, extraído da planta asiática *Camellia sinensis* (família Theaceae). Após a colheita, a sua preparação pode dar origem à cinco principais tipos de chás: o branco, o preto (indiano), o verde (japonês e chinês), o preto chinês (oolong) e o vermelho (também conhecido como Pu-erh) (Manfredini et al., 2004; Wu et al., 2007).

A composição fitoquímica das folhas e flores da *Camellia sinensis* é dependente de diversos fatores, dentre eles, o clima, práticas de cultivo, estação do ano, variedade e idade da planta. Estudos recentes têm demonstrado os benefícios à saúde humana ao consumir este chá no dia a dia, o qual contribui no tratamento de diversas doenças através do seu potencial anticarcinogênico, propriedades antioxidantes, hipoglicemiante e anti-inflamatória (Oliveira, 2012). Entre as substâncias presentes nos chás, estão as proteínas, glicídios, ácido ascórbico e fólico, manganês, potássio, vitaminas do complexo B, polifenóis, monossídeos de flavonoides e flavonas, taninos, cafeína, epicatecóis livres e esterificados pelo ácido gálico, e a epigallocatequina-3-galato (EGCG). (Miyazaki, 2008).

Aproximadamente 26,7% dos compostos totais presentes no chá verde, correspondem aos monômeros de catequinas (Schmitz et al., 2005). As catequinas (flavonoides) atuam na inativação dos radicais doando elétrons através dos átomos de hidrogênio para o oxigênio, evitando assim a produção deles no organismo (Lodi e Navarro, 2011), além disso, também possuem atividades quimioprotetoras, que impedem o crescimento de células cancerígenas no organismo (Silva e Navarro, 2007; Saigg e Silva, 2009).

2.5.2. *Bauhinia* sp.

Conhecida popularmente como pata-de-vaca, unha-de-vaca, entre outros nomes, *Bauhinia* sp., é uma planta arbustiva, decídua, grande ou arbórea, perene, que pode atingir até 8 metros de altura e está classificada na família Fabaceae de acordo com a lista de espécies da Flora do Brasil (Vaz, 2010). Seus

frutos são legumes (vagens) achatados e deiscentes (Lorenzi e Matos, 2002). Esse gênero é comumente utilizado como ornamentais em jardins e praças, sendo amplamente distribuídas, com cerca de 300 espécies, das quais 200 são brasileiras (Vaz e Tozzi, 2005). A pata-de-vaca é utilizada de forma terapêutica (Lorenzi e Matos, 2002), sendo considerada antidiabética, diurética (Silva & Cechinel Filho, 2002) e hipocolesterolemizante (Lorenzi e Matos, 2002).

Muitos estudos sobre sua composição fitoquímica indicam a presença de glicosídeos, ácidos orgânicos, sais minerais, taninos, pigmentos e mucilagens nas espécies de *Bauhinia* (Lorenzi e Matos, 2002). O efeito hipoglicêmico e potencial antioxidante do flavonoide kaempferitrina também foram encontradas na espécie *B. forficata*, (De Souza et al., 2004). Além disso, extratos etanólicos de *B. variegata* revelaram atividade quimiopreventiva e efeitos citotóxicos sobre tumores de fígado de rato e linhagens celulares cancerígenas humanas (Rajkapoor et al., 2006).

2.5.3. Tintura de Vegetais

A tintura é uma formulação muito conhecida nos receituários de plantas medicinais (Matos, 2000; Velloso e Peglow, 2003) e consiste numa solução preparada com etanol, misturas hidroalcoólicas em diversas concentrações, éter ou misturas destes, na qual uma parte dos princípios ativos deve ser extraída em proporções que variam entre mais de duas e menos de dez partes do líquido extrator (Sonaglio et al., 2003). Além disso, podem ser preparadas com uma ou mais matérias-primas, sendo assim classificadas em simples e compostas (Farmacopeia, 2019).

2.6. O Modelo Experimental

Considerando que os Teleostei hermafroditas constituem um excelente modelo biológico para estudos a respeito da remodelação gonadal, uma vez que sofrem naturalmente inversão do sexo, e dadas as informações até então inexistentes sobre o papel das MMPs nas alterações do tecido gonadal dos peixes durante sua diferenciação gonadal, tomou-se como modelo experimental *Danio rerio*, por apresentar hermafroditismo juvenil.

Danio rerio conhecido popularmente como paulistinha ou *zebrafish*, é um pequeno peixe tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae, Ordem

Cypriniformes (Nelson et al., 2016). Muito popular na aquarioria como espécie ornamental, apresenta grande tolerância a variações ambientais e a manipulações em cativeiro. Tem um comprimento total que varia de 2.0 a 4.0 cm e pode viver até três anos de idade (Dammski et al., 2011) ou mais em cativeiro (observação pessoal).

Nativo do sul da Ásia, o *Danio rerio* é originário dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal. São onívoros e, na natureza, suportam grandes variações de pH (5.9 a 8.5) e temperatura (16 a 38°C). Vivem em cardumes e se acasalam em grupos, durante o início da manhã. As fêmeas espalham seus ovos sobre o substrato, sem apresentar cuidado parental. Os ovos, demersais e não adesivos, desenvolvem-se rapidamente, dando origem às larvas após o período de 24 a 48h (Dammski et al., 2011).

Danio rerio é espécie que vem sendo cada vez mais utilizada como modelo experimental nas mais diversas áreas de pesquisas científicas, incluindo estudos referentes à saúde e doenças humanas. As principais justificativas para isso devem-se ao seu pequeno tamanho, facilidade na criação e manutenção, e por apresentar importante homologia com os mamíferos, incluindo roedores e humanos (Lieschke et al., 2007).

Por apresentar um estado de hermafroditismo juvenil durante sua diferenciação gonadal, no qual metade da população, fenotipicamente feminina, passa por um processo de remodelação gonadal, resultando na formação de uma gônada masculina (Takahashi, 1977; Uchida et al., 2002; Siegfried e Nüsslein-Volhard, 2008), *Danio rerio* constitui-se de um excelente modelo experimental para o desenvolvimento da proposta aqui apresentada, bem como para estudos no campo da biologia reprodutiva, devido à sua alta taxa reprodutiva, rápido desenvolvimento embrionário e ciclo de vida (Dammski et al., 2011). Dada essa enorme versatilidade da espécie, a aquicultura tem sido grandemente beneficiada pela expansão das pesquisas com *Danio rerio*, uma vez que os resultados obtidos em laboratório podem, muitas vezes, ser aplicados para outras espécies de Teleostei, especialmente àquelas de difícil manipulação.

3. OBJETIVOS

Com base nas informações apresentadas, o presente trabalho visou avaliar a ação de compostos naturais como possíveis agentes inibidores de metaloproteinases (TIMPs) na inversão sexual de *Danio rerio*, durante seu hermafroditismo juvenil. Para tanto, a proposta avaliou, concomitantemente, a ação das MMPs ao longo do processo de remodelação tecidual, bem como seu papel nas alterações morfofisiológicas da gônada de *Danio rerio*.

3.1. Objetivos Específicos

1) Analisar o processo de formação do compartimento germinativo e intersticial de *Danio rerio* durante o período de diferenciação gonadal sob condições normais e sob a ação de compostos naturais (*Camellia sinensis* e *Bauhinia* sp.);

2) Avaliar a ação de dois compostos naturais (*Camellia sinensis* e *Bauhinia* sp.), como possíveis inibidores de metaloproteinases de matriz (TIMPs) durante a diferenciação gonadal no hermafroditismo juvenil de *Danio rerio*;

3) Realizar a imunolocalização das metaloproteinases MMP-2, MMP-9 e MMP-14 durante os processos de inversão sexual em juvenis de *Danio rerio* em animais tratados com os compostos naturais e em animais controle;

4) Verificar se houve inversão sexual definitiva em animais tratados com *Camellia sinensis* e *Bauhinia* sp.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Os animais

Animais adultos de *Danio rerio* (24 fêmeas e 48 machos) adquiridos por reprodução em cativeiro junto ao Grupo de Pesquisa de Biologia da Reprodução de Peixes e Organismos Aquáticos (BIOREPOAQUA) na cidade de Alfenas - MG, foram transferidos para o laboratório e mantidos por 40 dias para aclimação em aquário de 200 litros, com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.0 \pm 2.0$ e fotoperíodo ambiente. Após aclimação dos espécimes, 09 indivíduos adultos (03 fêmeas e 06 machos) foram transferidos para aquários individuais de 30 litros para montagem dos grupos experimentais, totalizando 08 aquários (02 aquários para cada grupo, com 09 espécimes por aquário e 18 espécimes por grupo). Durante todo período de quarentena e experimentação, os peixes adultos foram alimentados exclusivamente com ração comercial para peixes “Tetra® Color Bits” e “Alcon Basic® Large Flakes”, duas vezes ao dia.

4.2. Obtenção da Tintura

A obtenção da tintura de ambas os espécimes vegetais utilizadas neste trabalho (*Camellia sinensis* e *Bauhinia* sp.) foi realizada em laboratório, seguindo o protocolo proposto por Schiedeck e colaboradores (2008).

As folhas das duas plantas foram adquiridas em uma loja de produtos naturais na cidade de Alfenas-MG. O material foi seco à 60°C em estufa por 24h e em seguida triturado. Para a obtenção da tintura, 200g das folhas trituradas foram misturados em 800mL de etanol etílico hidratado (álcool de cereais 96%) a 70% (v/v). Essa solução permaneceu em repouso por 4 semanas e após esse período, foi realizada a peneiração para retirada dos fragmentos maiores de vegetais. A solução foi filtrada em filtros Whatman de fibra de vidro de $0,6\mu\text{m}$. A tintura foi armazenada em recipientes de vidro âmbar com tampa vedadora e guardadas em geladeira.

4.3. Os Grupos Experimentais

Os animais foram separados em 4 grupos: Grupo Controle (GC); Grupo 1 (tintura de *Camellia senensis*); Grupo 2 (tintura de *Bauhinia* sp.) e Grupo 3 (pedaços de tronco da árvore pata-de-vaca *Bauhinia* sp.) e mantidos igualmente

em aquários individuais de 30 litros, com os mesmos parâmetros anteriores da água. Foram montados 08 aquários, sendo 02 aquários, contendo 03 fêmeas e 06 machos, para cada grupo experimental. Durante 07 dias, fêmeas e machos de cada aquário foram mantidos separadamente no mesmo aquário por uma tela vertical, a fim de evitar desova antes do período de tratamento completo.

Na semana seguinte, as telas foram removidas no período da manhã e após 5 ± 1 h, a desova ocorreu em todos os grupos. Os grupos foram tratados durante os 07 dias que antecederam a desova. Os Grupos 1 e 2, receberam a quantidade de 30 gotas (1500µl a concentração de ~1,6g/L) ao dia de tintura de *Camellia sinensis* e de *Bauhinia* sp., respectivamente. No Grupo 3, foram adicionados, no primeiro dia do experimento (ou seja, sete dias antes da desova), 500g de fragmentos de troncos da árvore pata-de-vaca (*Bauhinia* sp.).

O Grupo Controle recebeu 28 gotas ao dia de álcool de cereais a 70% (diluído em água destilada) + 02 gotas de acidificante “Labcon® Acid” para baixar gradualmente o pH da água. Não houve renovação de água de nenhum dos aquários ao longo de experimento. Não foi utilizada bomba de aeração.

Durante o experimento, os valores de pH foram mensurados diariamente em todos os aquários, utilizando um phmetro de bancada (Mylabor) para avaliar a acidificação da água na presença dos compostos naturais.

Após a desova, os adultos foram retirados dos aquários de reprodução. Os ovos, larvas e juvenis foram mantidos nas águas já tratadas dos aquários pelos próximos 20 dias. Durante este período, não foram acrescentados novos compostos naturais na água dos aquários.

Os ovos e larvas ($n = 10$ por coleta) foram coletados diariamente por 14 dias pós-fertilização (dpf). Dos 14 ao 30dpf, a coleta dos juvenis ocorreu periodicamente a cada 2 dias. A partir dos 30dpf, os animais foram coletados a cada 3 dias até apresentarem diferenciação gonadal completa, em torno de 70dpf (Uchida et al., 2002). Entretanto, após 20dpf, os juvenis foram transferidos para aquários de 50 litros, com água livre de compostos naturais e/ou troncos, temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, pH = 7.0 e fotoperíodo ambiente.

A última coleta ocorreu aos 90dpf para verificar a porcentagem de machos e fêmeas na população. Todos os espécimes coletados foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína, dissolvida em álcool absoluto na dose de 1mg^{-1} , e eutanasiados de acordo com as normas da Comissão de Ética

4.4. Preparação do Material para a Microscopia de Luz

As amostras foram fixadas *in totum* em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. Após fixação, o material foi desidratado em uma série crescente de álcool etílico (70% por 4 horas; 95% por 4 horas), infiltrados e incluídos em historesina (glicol-metacrilato) – Leica historesin. Os cortes histológicos seriados com 3µm de espessura, obtidos em micrótomo equipado com navalhas de aço foram submetidas a diferentes colorações: Hematoxilina Férrica/Eosina (HE); Azul de Toluidina-Bórax (AT); e Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (MY) (Quintero-Hunter et al., 1991). O Método de Reticulina (MR), que envolve impregnação por prata, foi empregado para o acompanhamento da remodelação da membrana basal ao longo do processo de inversão sexual durante o hermafroditismo juvenil, conforme proposto por Mazzoni e colaboradores (2015). Além do tecido gonadal, os fígados também foram avaliados, a fim de identificar possíveis hepatotoxicidades. A documentação do material foi realizada através de um sistema de foto-documentação digital (AMScope MU-1000 Software) pertencente ao Grupo de Pesquisa BIOREPOAQUA.

4.5. Imunohistoquímica para localização das Metaloproteinases (MMPs)

Os embriões, larvas e juvenis foram fixados *in totum* em solução de paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2), por 12 horas e mantidos em álcool etílico até o processamento. A imunohistoquímica das amostras também foi realizada *in totum*, conforme protocolo proposto por Mazzoni e Quagio-Grassiotto (2020). As amostras foram lavadas em Sorensen por 1 hora, submetidas à recuperação antigênica por calor, em panela à vapor, imersas em tampão citrato (0,01 M, pH 6.0) por 15 minutos à temperatura de aproximadamente 95°C. Logo em seguida, as amostras foram lavadas em tampão PBS e incubadas com 3% de peróxido de hidrogênio em tampão por 10 minutos para inativar a peroxidase endógena dos tecidos. Sequencialmente, foram lavadas em tampão de bloqueio (BSA 1% + TRITON X-100 + leite em pó) diluído em PBS por 1 hora para permitir a permeabilização e para bloquear a

reação inespecífica dos anticorpos nos tecidos. As amostras foram incubadas com anticorpos primários (ABCam na proporção de 1:200) anti-MT1-MMP (MMP14), anti-MMP2 ou anti-MMP9 por 2 horas à temperatura ambiente em mesa agitadora. Após incubação com anticorpo primário, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, por 1 hora à temperatura ambiente. A atividade da peroxidase para todas as imunorreações foi revelada através da incubação dos material com 0,05% de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) em tampão PBS contendo 0.05% de peróxido de hidrogênio por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas em água destilada e re-fixadas em Karnovsky por 24 horas. O material foi processado para inclusão em historesina e os cortes seriados obtidos foram corados com Hematoxilina de Harris.

4.6. Zimografia *in situ*

Para localizar e comprovar a presença de atividade gelatinolítica do material, foi realizada uma zimografia *in situ* de acordo com a técnica proposta por Mazzoni e colaboradores (2018). As gônadas de juvenis foram fixadas em 36.7mM ZnCl₂ + 0.1 M Tris (pH 7.4) por 12 horas, antecedendo a desidratação e inclusão em paraplast (Sigma-Aldrich). Os cortes foram mantidos à 59°C overnight, desparafinizados em xilol e reidratado com banhos graduais de etanol. O substrato foi preparado dissolvendo 1mg de gelatina DQ em 1mL de água Milli-Q e foi posteriormente diluído 1:50 em tampão de reação contendo TRIS-HCl 50mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 5mM e Azida de Sódio 0.2mM (pH 7.6). Dessa mistura, 250µL foram colocados sobre os cortes histológicos, cobertos por Parafilm e incubado em câmara úmida escura à 37°C. Após 2 horas, o Parafilm foi removido e os cortes foram lavados com água Milli-Q e fixados em formalina tamponada (4%) por 10 minutos no escuro. Os cortes foram lavados em banhos de PBS (5 minutos) e montados com Fluoroshield Mounting Medium com DAPI (Sigma-Aldrich). Para verificar a contribuição das MMPs, lâminas para controle negativo foram pré-incubadas com EDTA 20mM por 1 hora. O EDTA 20mM também foi adicionado ao substrato. Os cortes foram analisados usando microscópio fluorescente (Nikon Eclipse 80i), usando filtro FITC, conforme instruções do fabricante.

4.7. Análise Estatística

A porcentagem do número de indivíduos masculinos, femininos e em remodelação gonadal analisados foram submetidos à análise variância (one way ANOVA) e ao teste de Tukey (Statistica® 7.0), quando obtido dados com diferença significativa (com nível de significância $(p) < 0.05$), assim como os valores de pH.

5. RESULTADOS

Durante a diferenciação gonadal de *Danio rerio*, os eventos celulares observados para o estabelecimento do epitélio germinativo tanto masculino, quanto feminino, foram os mesmos nos 4 grupos experimentais: Grupo Controle, Grupo 1 (tintura de *Camellia sinensis*), Grupo 2 (tintura de *Bauhinia* sp.), e Grupo 3 (troncos de *Bauhinia* sp.). Entretanto, a proporção sexual encontrada entre fêmeas e machos de cada grupo foi diferente.

Assim, inicialmente, serão descritos abaixo, os eventos celulares ao longo da diferenciação gonadal de *D. Rerio*, independente do grupo experimental a qual pertencem, visto que não houve diferença entre os processos celulares durante a diferenciação gonadal dos grupos tratados em relação ao Grupo Controle.

5.1. A Morfogênese Gonadal durante o Hermafroditismo Juvenil

5.1.1. O Primórdio Gonadal

Em todos os grupos experimentais, o primórdio gonadal (Fig. 1A-C) de *Danio rerio* manteve-se aos pares sobre o peritônio ao longo da cavidade celomática, presos por uma fina camada de mesentério gonadal. Cada primórdio gonadal localiza-se ventralmente ao rim e dorsalmente à bexiga natatória. Histologicamente, são formados apenas por células germinativas primordiais (CGPs) e células somáticas (Fig. 1B,C). As células somáticas apresentam forma variada, sendo predominantemente pavimentosas, com núcleo basófilo e citoplasma escasso. Já as CGPs são grandes células arredondadas com núcleo descondensado e volumoso (Fig. 1B,C). Apresentam um nucléolo bastante evidente e citoplasma escasso. O primórdio gonadal foi observado até o 10º dia pós-fertilização (dpf).

5.1.2. A Gônada Indiferenciada

O número de células germinativas primordiais (CGPs) e somáticas presentes no primórdio gonadal aumentou gradualmente ao longo do desenvolvimento gonadal, em animais de todos os grupos experimentais. Como resultado, tem-se um aumento do tamanho do tecido gonadal, que passa a constituir uma gônada indiferenciada, que apresenta abundante quantidade de

CGPs e intensa atividade mitótica. As gônadas indiferenciadas de *Danio rerio* foram observadas em animais medindo até 0,5 cm, os quais apresentavam de 10 a 14dpf.

Nesta etapa, as gônadas indiferenciadas mantêm-se aos pares e tornam-se mais alongadas, passando a ocupar 2/3 da cavidade celomática a partir da papila urogenital. São formadas por CGPs dispersas por entre células somáticas. Nas secções parassagittais, as gônadas indiferenciadas são mais espessas quando comparadas ao primórdio gonadal, devido a maior quantidade de células germinativas e somáticas.

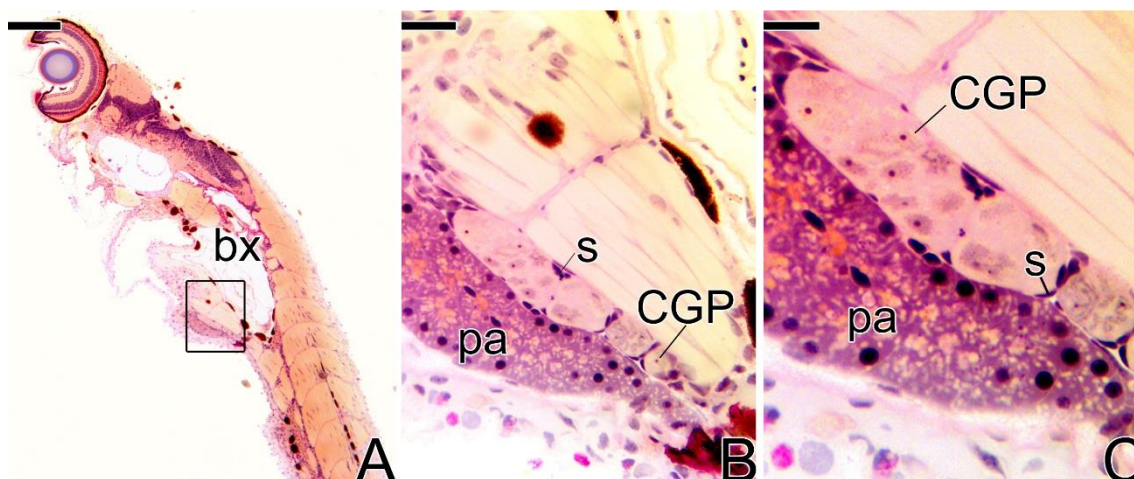


Figura 1: A-C) Corte histológico sagital de juvenil de *Danio rerio* (10dpf), mostrando o primórdio gonadal. bx: bexiga natatória, pa: pâncreas, s: células somáticas (epiteliais), CGP: células germinativas primordiais. Coloração: MY. Barra: 100µm (A), 20µm (B), 10µm (C).

5.2. Diferenciação Gonadal durante o Hermafroditismo Juvenil

As gônadas de *Danio rerio* não se diferenciam diretamente em um ovário ou testículo, apresentando, portanto, desenvolvimento gonocorístico indireto, ou seja, em todos os indivíduos desta espécie, o tecido gonadal desenvolve-se inicialmente em ovário, independente do sexo genotípico.

Entre 14 e 16dpf, todos os indivíduos dos 4 grupos experimentais apresentaram desenvolvimento de um tecido ovariano.

Entre 16 e 20dpf, em todos os grupos, parte dos indivíduos apresentaram degeneração do tecido ovariano e remodelação em um tecido testicular. No Grupo Controle, 54% dos espécimes analisados apresentaram remodelação do tecido gonadal, o qual passou a apresentar concomitantemente características

femininas e masculinas, até caracterização definitiva de uma gônada feminina e masculina em indivíduos diferentes, aos 30dpf. Já nos Grupos 1 e 2, no mesmo período de 16 a 20dpf, somente 31% e 33% dos indivíduos sofreram remodelação gonadal, respectivamente, enquanto o restante permaneceu com características femininas no tecido gonadal. O Grupo 3 apresentou 56% de indivíduos com remodelação gonadal. Esses dados foram apresentados na Figura 2.

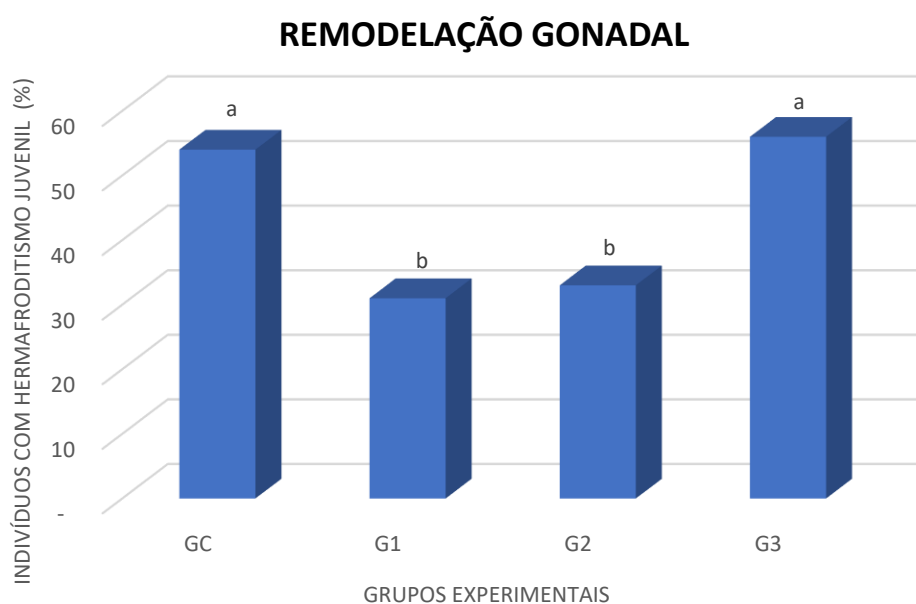


Figura 2: Frequência (%) de indivíduos analisados apresentando remodelação gonadal no período de 16 a 20dpf. Diferentes letras denotam diferenças significativas ($p < 0.05$). Legenda: GC (Grupo Controle); G1 (Grupo 1 - tintura de *Camellia senensis*); G2 (Grupo 2 - tintura de *Bauhinia* sp.) e G3 (Grupo 3 - pedaços de tronco da árvore pata-de-vaca).

Em todos os grupos, o restante dos indivíduos que não apresentaram remodelação gonadal, ou seja, indivíduos supostamente femininos, mostraram uma contínua progressão no desenvolvimento do tecido ovariano. Assim, parte da população, em qualquer um dos grupos, apresentou entre 16 e 20dpf gônadas totalmente desenvolvidas em um ovário ou em gônadas transicionais com características masculinas e femininas.

5.2.1. Diferenciação Ovariana

5.2.1.1. Folliculogênese

A diferenciação ovariana em *Danio rerio* ocorreu precocemente, em animais que apresentavam apenas 16dpf, em todos os grupos (Fig. 3A). As

primeiras etapas do processo foram caracterizadas pela entrada das células germinativas, agora oogônias, em meiose e início do processo de foliculogênese (Fig. 3B,C).

No início do processo de diferenciação gonadal, as oogônias, imersas no tecido gonadal, podem estar associadas ou não às células somáticas. Oogônias isoladas proliferam por mitose dando origem a novas oogônias (Fig. 3B,C). Quando associadas às células somáticas formam um cisto de oogônias, que ao entrar em meiose originam cistos de oócitos profásicos iniciais (Fig. 3B-E). Uma vez que cada oogônia dá origem um cisto e tendo início as divisões celulares, formam-se diferentes cistos próximos um do outro, originando grupamentos (conjuntos celulares), delimitados gradativamente por uma mesma membrana basal em formação (ver descrição adiante). Assim, ao longo de toda gônada, observam-se oogônias isoladas individualmente entre células somáticas, e cistos delimitados por células somáticas derivadas do epitélio, contendo oogônias e/ou oócitos profásicos iniciais (Fig. 3B-F).

As oogônias são células arredondadas que apresentam citoplasma escasso com granulações correspondentes às “nùages”, e núcleo grande, esférico com um ou mais nucléolos bem evidentes. Os oócitos, presentes nos cistos são também arredondados, com núcleo contendo cromatina em distintas formas de organização de acordo com a etapa da prófase em que se encontram, porém seus citoplasmas não os diferem, mantendo-se sempre ligeiramente acidófilo e escasso.

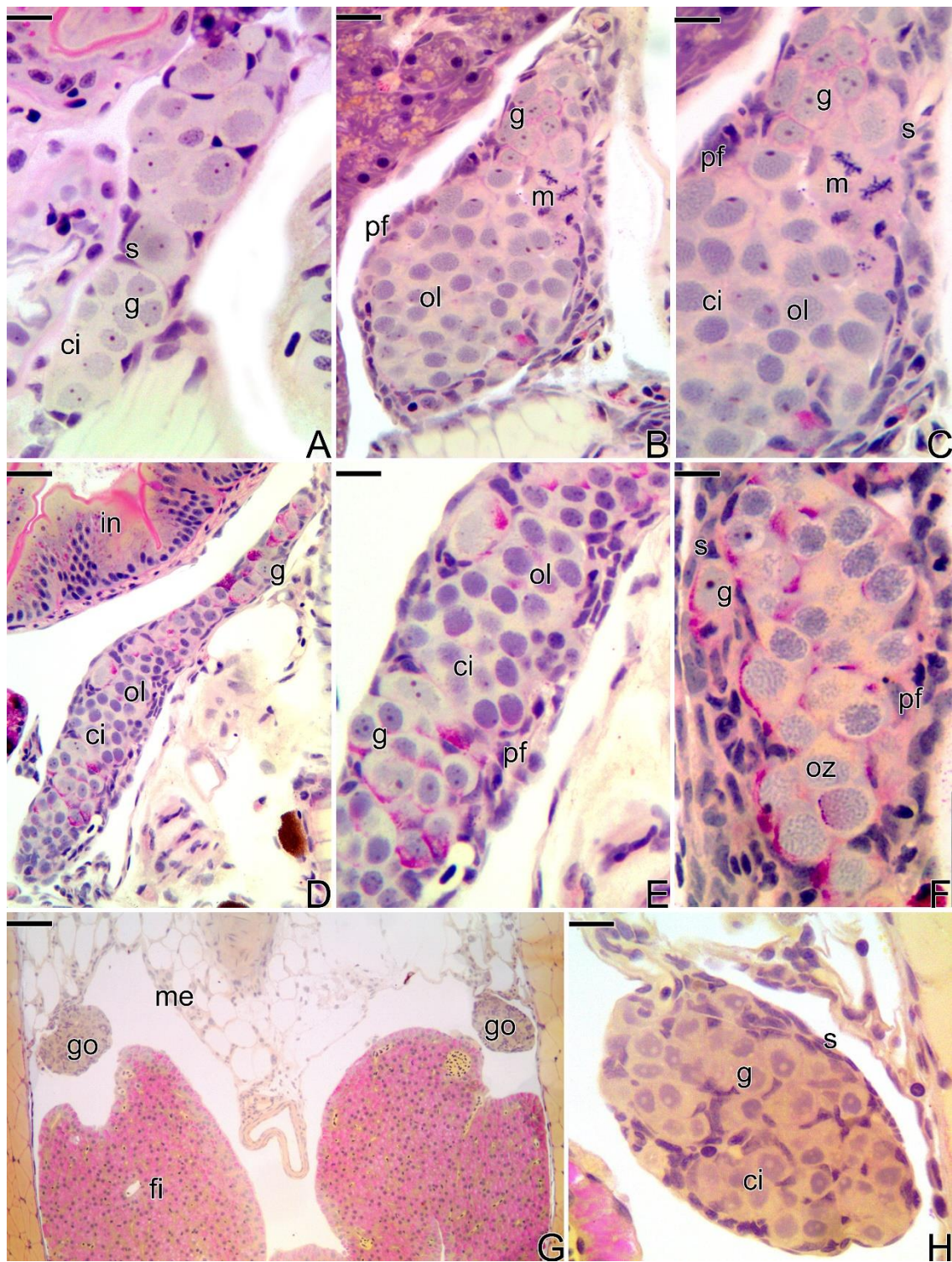


Figura 3: A-F) Cortes sagitais mostrando o processo de diferenciação da gônada feminina de *Danio rerio* (16dpf) a partir de uma gônada indiferenciada (A). B-F) Formação de cistos de oócitos profásicos iniciais. G-H) Corte transversal da gônada indiferenciada. S: célula somática, ci: cistos germinativos, g: oogônias, ol: oócito leptotênico, m: metáfase, pf: célula pré-folicular, in: intestino, oz: oócito zigotênico, go: gônada, me: mesentério. Coloração: MY. Barra: 10µm (A,C,E,F), 20µm (B,H), 25µm (D), 100µm (G).

Os oócitos profásicos apresentam inicialmente núcleo mais basófilo do que as oogônias. O oócito leptotênico apresenta núcleo fortemente basófilo, com

ao menos um nucléolo bastante evidente (Fig. 3B-E). Com a progressão da prófase, ocorre perda gradual da basofilia nuclear do oócito. O oócito em zigóteno (Fig. 3F) apresenta maior condensação cromossômica, dando um aspecto granular ao núcleo.

Em cortes transversais, a gônada de animais com 16dpf apresenta um formato regular e oval, sendo delimitada externamente por um epitélio simples pavimentoso (Fig. 3G,H).

Em animais com 18dpf, os cistos agora contendo oócitos em final de paquíteno e início de diplóteno (Fig. 4A-C) são invadidos pelas células somáticas epiteliais – as agora células pré-foliculares. As células pré-foliculares envolvem total e gradativamente cada oócito que se separa do cisto, dando origem a um folículo ovariano (Fig. 4C-F). Durante esse processo conhecido como foliculogênese, as células pré-foliculares, após se diferenciarem em células foliculares, iniciam a formação da membrana basal. Gradativamente, a membrana basal é sintetizada individualizando cada folículo ovariano. Aos 18dpf, com a entrada e permanência do oócito em diplóteno, o citoplasma aumenta em volume tornando-se gradualmente mais basófilo, dando início ao crescimento primário (Fig. 4G-I). O oócito diplotênico agora isolado no folículo ovariano, e em crescimento primário, apresenta núcleo com um número variável de nucléolos. O tecido gonadal expande-se em comprimento e largura, devido ao aumento do número e tamanho de oócitos e de cistos germinativos. Nessa etapa da diferenciação ovariana, a gônada mostra-se ainda compacta (Fig. 4G-I).

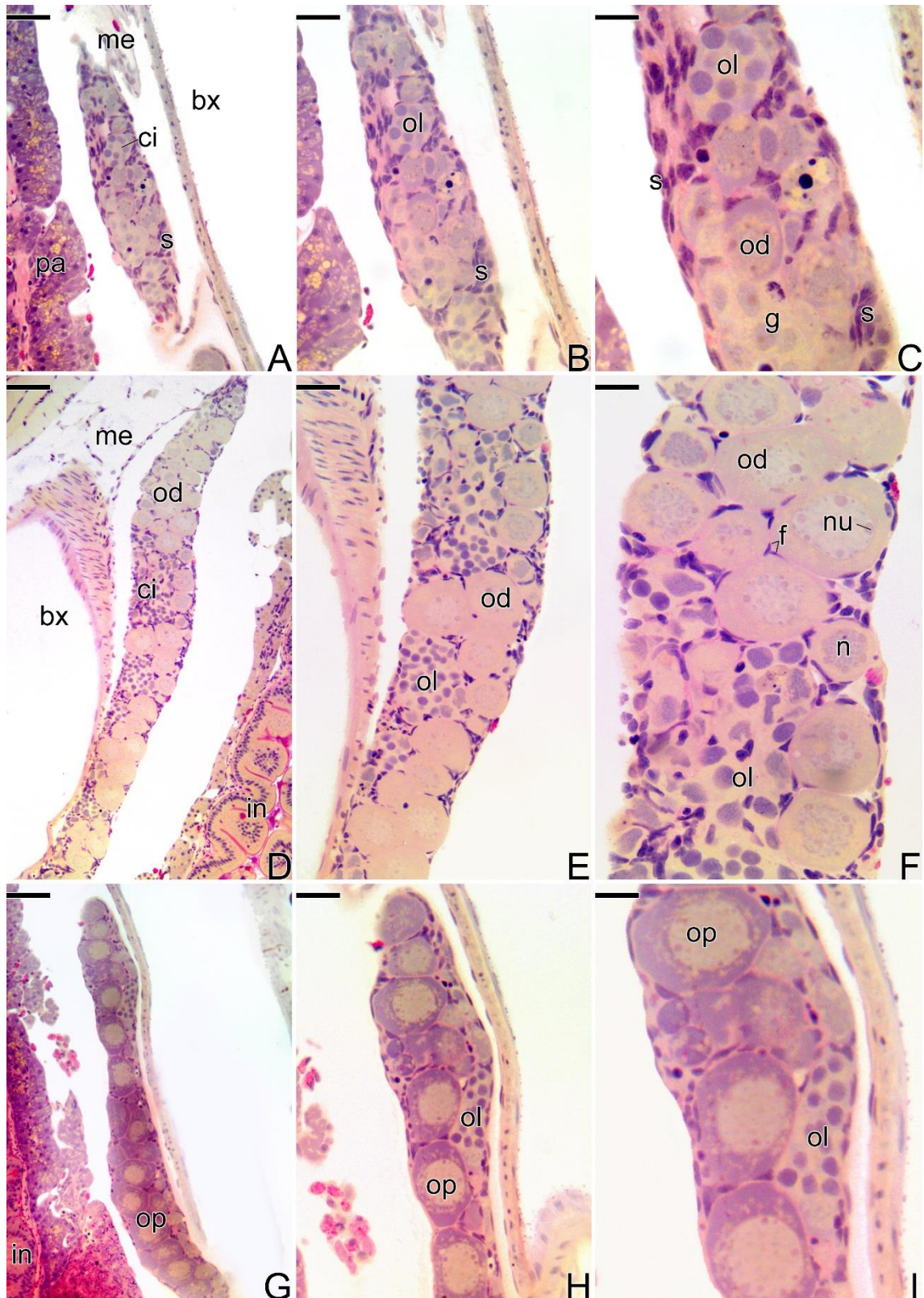


Figura 4: Cortes sagitais mostrando o processo de diferenciação da gônada feminina de *Danio rerio* (18dpf). Com o progresso da meiose, a gônada aumenta em comprimento, bem como os cistos germinativos. Os oócitos entram em crescimento primário, porém a gônada ainda permanece como uma estrutura compacta. me: mesentério, bx: bexiga natatória, pa: pâncreas, s: célula somática, ci: cistos germinativos, g: oogônia, ol: oócito leptotênico, od: oócito diplotênico, in: intestino, n: núcleo, nu: nucléolo, f: célula folicular, op: oócito em crescimento primário. Coloração: MY. Barra: 40µm (A,D,G), 30µm (B,E,H), 20µm (C,F,I).

5.2.1.2. Formação das Lamelas Ovígeras e o Epitélio Germinativo

A formação das lamelas ovígeras em *Danio rerio* teve início aos 20dpf, nos Grupos Controle e Grupo 3. Nesta etapa, há grande quantidade de oócitos em crescimento primário, além de oogônias e cistos de oócitos profásicos (Fig. 5A-C). Em ambos os grupos, durante a formação das lamelas ovígeras, perpendicularmente ao tecido gonadal, células somáticas na região dorsal da gônada reorganizam-se, criando fileiras paralelas entre si no interior da gônada. Estas fileiras de células, ao se afastarem, formam invaginações ao longo do ovário, delimitando, assim, as lamelas ovígeras (Fig. 5A-F). Nestas regiões de formação de fileiras de células somáticas, houve resposta positiva para a detecção por imunohistoquímica para a metaloproteinase de matriz MMP-9 (Fig. 5G,H). Os espaços interlamelares formados tornam-se cada vez mais profundos e, gradualmente, as lamelas aumentam em tamanho. Na região de projeção e formação das lamelas ovígeras, células somáticas periféricas ao tecido gonadal reorganizam-se formando um epitélio que margeia as lamelas recém-formadas (Fig. 5D-F). Este epitélio recém-formado isola as células germinativas do lúmen interlamelar. Assim, oogônias aprisionadas entre as células epiteliais constituem agora o epitélio germinativo feminino de *Danio rerio*.

Concomitantemente à formação das lamelas ovígeras, o estroma ovariano do Grupo Controle e Grupo 3 inicia sua diferenciação, mostrando-se ainda pouco desenvolvido (Fig. 5F).

Aos 22 dias pós-fertilização, no Grupo Controle e no Grupo 3, os oócitos em crescimento primário tornam-se ainda maiores (Fig. 5I) e na periferia de seu citoplasma, vesículas começam a ser formadas, constituindo os alvéolos corticais (Fig. 5J,K), PAS positivos, devido à sua natureza polissacarídica. Ao fim do crescimento primário, uma camada acelular glicoproteica, PAS positiva, conhecida como zona pelúcida (Fig. 5K), é sintetizada entre o oócito e as células foliculares. O ovário destes grupos mostram-se com lamelas ovígeras totalmente desenvolvidas e definidas (Fig. 5I-K).

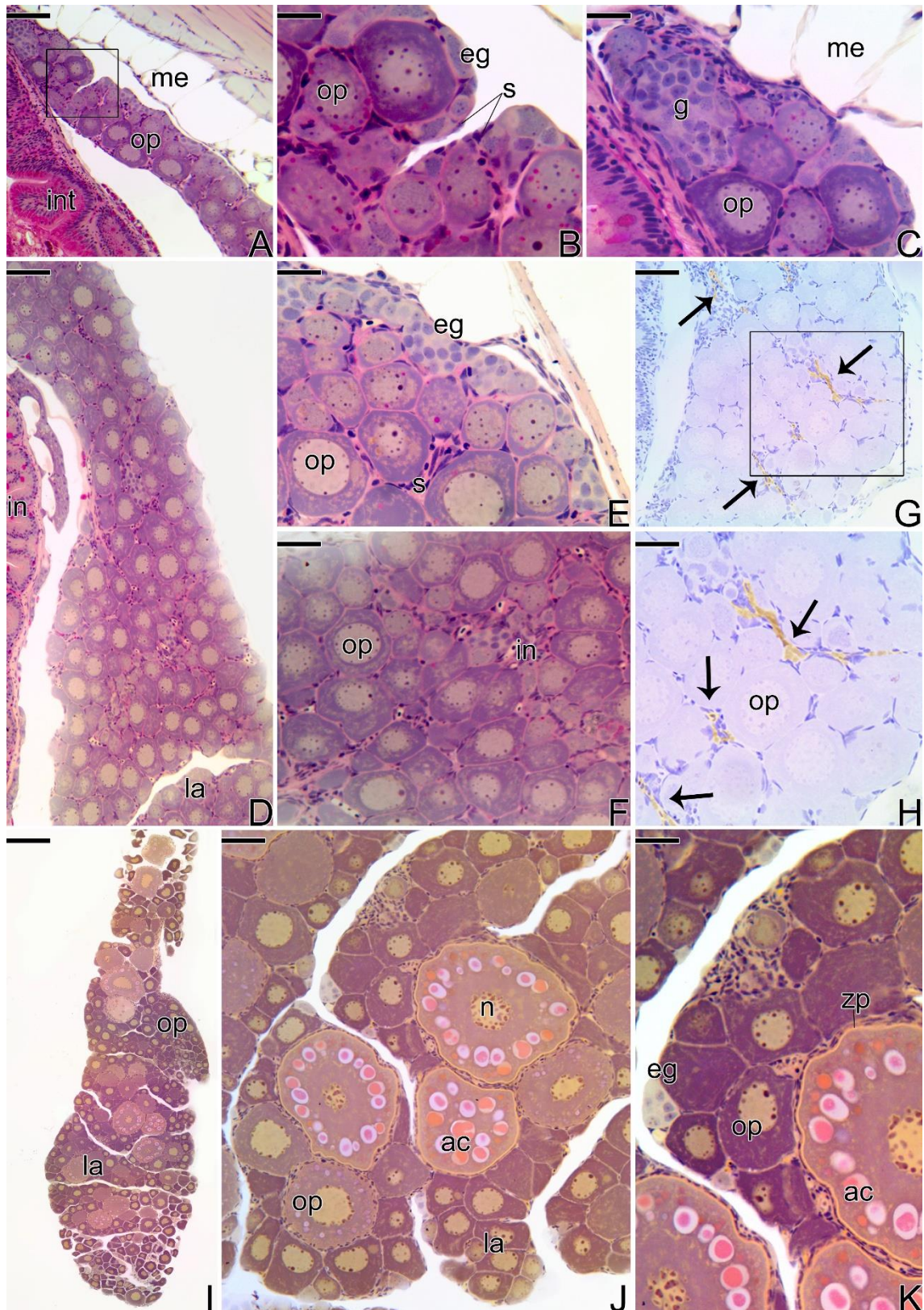


Figura 5: A-H) Cortes sagitais mostrando o processo de diferenciação formação das lamelas ovígeras em *Danio rerio* (20dpf). G-H) Imunohistoquímica para detecção positiva da MMP9 (seta) em células somáticas que participam do processo de formação das lamelas. I-K) Corte longitudinal de um ovário completamente diferenciado em *Danio rerio* (22dpf). me: mesentério, op: oócito em crescimento primário, int: intestino, eg: epitélio germinativo, s: célula somática, in: interstício, la: lamela ovígera, n: núcleo, ac: alvéolo cortical, zp: zona pelúcida. Coloração: MY, Hematoxilina (G,H). Barra: 50µm (A,D,G,J), 25µm (B,C,E,F,G,H,K), 20µm (H), 100µm (I).

Entre 20 e 22dpf, nos Grupos 1 e 2, embora houvesse grande quantidade de oócitos entrando em crescimento primário, além de oogônias e cistos de oócitos profásicos, as lamelas ovígeras não mostravam-se nitidamente delimitadas e o tecido ovariano permaneceu ainda compacto (Fig. 6A-C). Esse tecido gonadal foi denominado aqui de ovário – tipo 1. Não houve imunolocalização para MMP-9 ou MMP-2 nos ovários dos indivíduos destes grupos (Fig. 6D) e o tecido ovariano ainda mostrava-se pouco organizado após a delimitação das primeiras lamelas ovígeras (Fig. 6E,F). Esses animais, com 22dpf do Grupo 1 e 2 apresentavam ovários relativamente menores que os ovários do Grupo Controle e Grupo 3.

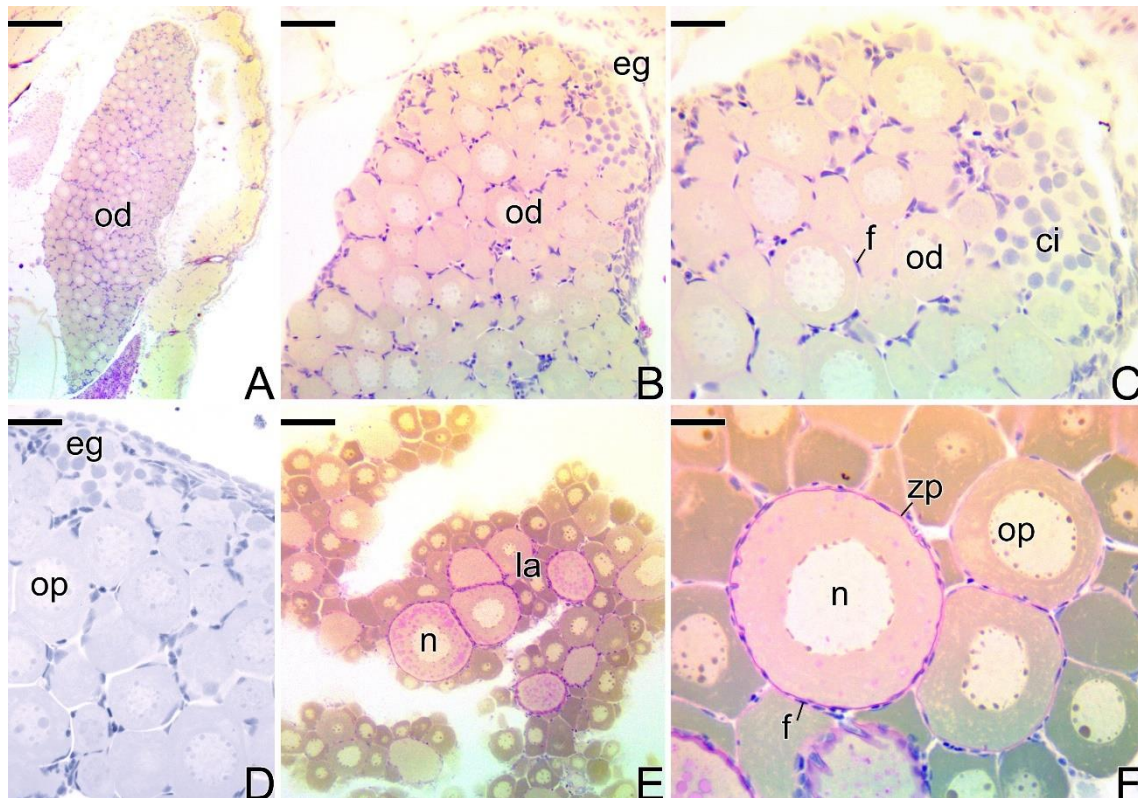


Figura 6: A-D) Cortes sagitais mostrando o processo de diferenciação do ovário em *Danio rerio* nos Grupos 1 e 2 (20dpf). D) Imunohistoquímica para detecção da MMP9 e MMP-2, que mostrou resposta negativa em todos os tipos celulares. I-K) Corte longitudinal de um ovário completamente diferenciado em *Danio rerio* (22dpf). Od: oócito diplotênico, op: oócito em crescimento primário, eg: epitélio germinativo, s: célula somática, la: lamela ovígera, n: núcleo, zp: zona pelúcida. Coloração: MY (A-C,E,F), Hematoxilina (D). Barra: 100µm(A,E), 50µm (B), 20µm (C,D,F).

Nos Grupos 2 e 3, 30% e 33%, respectivamente, dentre os indivíduos supostamente femininos, apresentaram ovários com tecido gonadal distinto das demais fêmeas (Fig. 7), seja dentro dos próprios grupos ou em relação ao Grupo

Controle. Estes ovários, denominados aqui de ovário - tipo 2, em animais com 22dpf mostravam-se desorganizados e com grande quantidade de granulócitos (Fig. 7A-C) no estroma ovariano (interstício). Os folículos ovarianos mostravam-se retraídos e algumas células gaméticas apresentavam aspecto de degeneração celular (Fig. 7C,D). Não houve detecção de MMP-9 e MMP-2 nestes ovários (Fig. 7D).

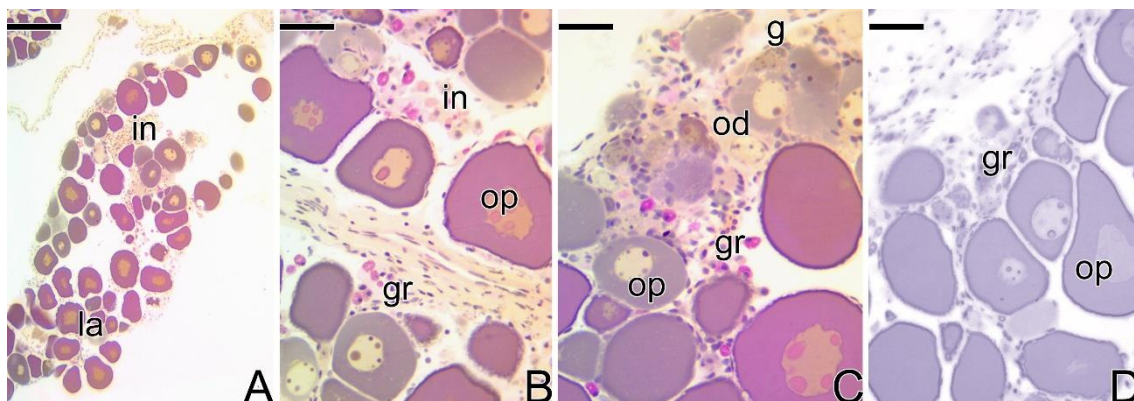


Figura 7: A-D) Cortes sagitais mostrando características do ovário – tipo 2 em *Danio rerio* nos Grupos 1 e 2 (22dpf). Note a grande quantidade de tecido intersticial e granulócitos, além da desorganização lamelar. D) Imunohistoquímica para detecção da MMP-9 e MMP-2, que mostrou resposta negativa em todos os tipos celulares. la: lamela ovígera, in: interstício, gr: granulócito, od: oócito diplotênico, op: oócito em crescimento primário. Coloração: MY (A-C), Hematoxilina (D). Barra: 100µm(A), 20µm (B,C,D).

Após 30dpf, os ovários dos animais dos Grupos 1 e 2 apresentaram ovários totalmente estabelecidos (Fig. 8). Alguns indivíduos do Grupo 1 ainda apresentavam ovários - tipo 2 (Fig. 8A), embora o tecido gonadal ovariano já estivesse totalmente definido, sem a presença de características tecido gonadal masculino. Os ovários – tipo 1 dos animais do Grupo 1 apresentaram lamelas ovígeras ainda pouco definidas (Fig. 8B), enquanto que os ovários do Grupo 2 (Fig. 8C) e do Grupo 3 (Fig. 8D), mostravam lamelas muito semelhantes às encontradas nos ovários do Grupo Controle.

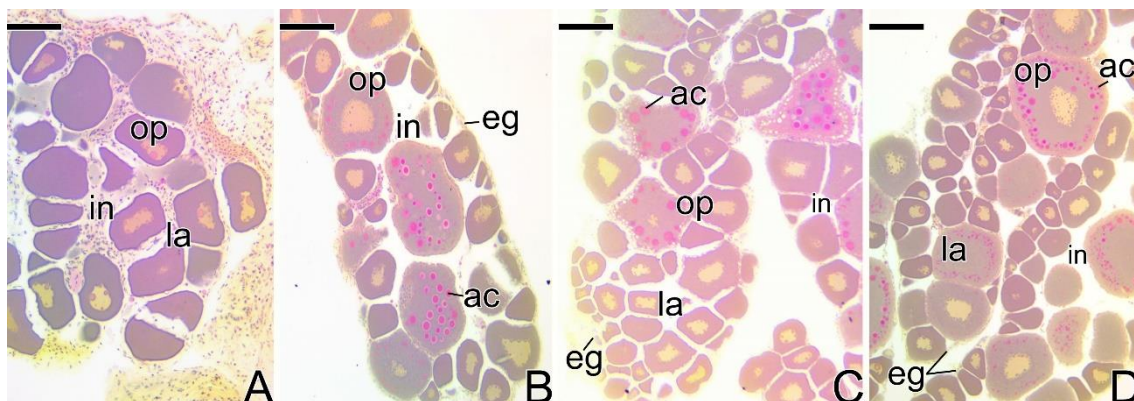


Figura 8: Cortes sagitais dos ovários de *Danio rerio* (30dpf) A) Ovário – tipo 2 do Grupo 1. B) Ovário – tipo 1 do Grupo 1. C) Ovário do Grupo 2 com lamelas ovígeras bem definidas. D) Ovário do Grupo 3 com lamelas ovígeras também definidas. la: lamela ovígera, in: interstício, op: oócito em crescimento primário, eg: epitélio germinativo, ac: alvéolos corticais. Coloração: MY. Barra: 100µm.

Neste período, aos 30dpf, os Grupos Controle, 1, 2 e 3 apresentaram 51%, 81%, 77% e 54% (Fig. 9) de animais com tecido gonadal feminino, respectivamente.

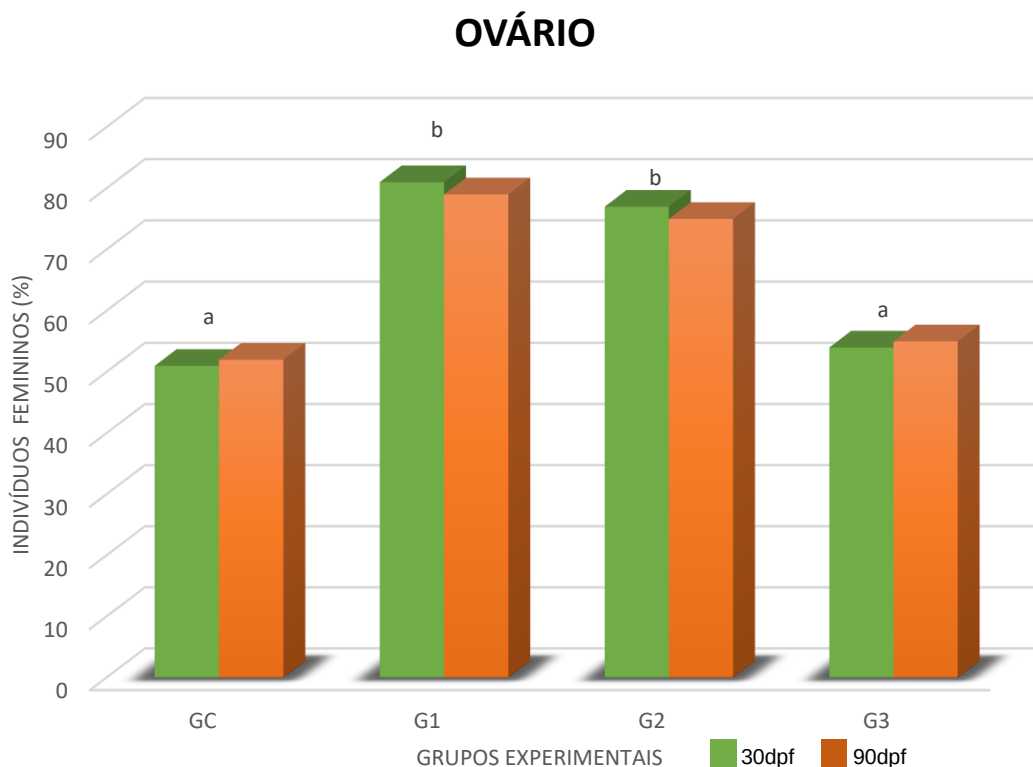


Figura 9: Frequência (%) de indivíduos analisados apresentando tecido gonadal feminino em animais com 30 e 90dpf. Diferentes letras denotam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$). Legenda: GC (Grupo Controle); G1 (Grupo 1 - tintura de *Camellia senensis*); G2 (Grupo 2 - tintura de *Bauhinia* sp.) e G3 (Grupo 3 - pedaços de tronco da árvore pata-de-vaca).

5.2.2. Diferenciação Testicular

Em todos os grupos, entre 14 e 16dpf, observam-se dois tipos de tecidos ovarianos: o primeiro, caracteristicamente feminino (conforme descrito acima), e o segundo, com uma maior quantidade de células somáticas, tecido intersticial mais desenvolvido e presença de granulócitos (Fig. 10A-C). Este segundo tipo de tecido gonadal foi descrito aqui como um tecido gonadal supostamente masculino, porém, a quantidade de indivíduos com este tipo gonadal variou entre os 4 grupos experimentais. Assim, entre os espécimes analisados com idades

entre 16 e 20dpf, esta gônada em processo de remodelação tecidual foi detectada em 54% dos indivíduos do Grupo Controle, em 31% dos indivíduos do Grupo 1, em 33% dos indivíduos do Grupo 2 e em 56% dos indivíduos do Grupo 3, conforme já apresentado na Figura 2. Este tecido gonadal passou a apresentar concomitantemente características femininas e masculinas, até caracterização definitiva de uma gônada masculina.

O tecido gonadal supostamente masculino, de animais com 16dpf, em qualquer um dos grupos, é formado por uma grande quantidade de células somáticas que aumentam consideravelmente, além de cistos germinativos, compostos de oócitos profásicos e oogônias (Fig. 10B,C). Nesta etapa, os primeiros sinais de apoptose e o aumento da infiltração de células fagocíticas são observados ao longo de todo tecido gonadal (Fig. 10C).

Aos 18dpf, observa-se uma aparente queda no número de cistos de oócitos profásicos e o tecido gonadal mostra-se bastante desorganizado (Fig. 10D-F). Células fagocíticas como macrófagos e granulócitos são facilmente observadas. Em cortes transversais, observa-se também a desorganização do tecido gonadal, o qual apresenta um formato bastante irregular (Fig. 10G,H).

Em indivíduos supostamente masculinos com 20dpf, foram observadas gônadas em transição, com características femininas e masculinas, em um mesmo tecido gonadal (Fig. 11A). Nesta etapa, o tecido gonadal aumenta em comprimento e surgem pequenos espaços intra-teciduals (Fig. 11A-D). Estes espaços formados são primórdios de um compartimento luminal. As primeiras células germinativas masculinas misturam-se aos oócitos diplotênicos remanescentes. Observam-se um pequeno número de espermatogônias, espermatócitos e espermatozoides (Fig. 11D,F). Corpos apoptóticos são ainda observados com frequência (Fig. 11E).

Aos 22dpf, o epitélio germinativo estabelece-se totalmente a partir dos espaços recém-formados (Fig. 11G). Espermatogônias já encistadas por células somáticas associam-se às células somáticas que constituem o compartimento luminal, sendo incorporadas junto ao epitélio, formando assim, o epitélio germinativo masculino de *Danio rerio* (Fig. 11H,I). Com a rápida entrada das espermatogônias em meiose, nota-se o aumento de cistos de espermatócitos por todo o tecido gonadal (Fig. 11H,I). Agora, o tecido gonadal exibe características de um testículo.

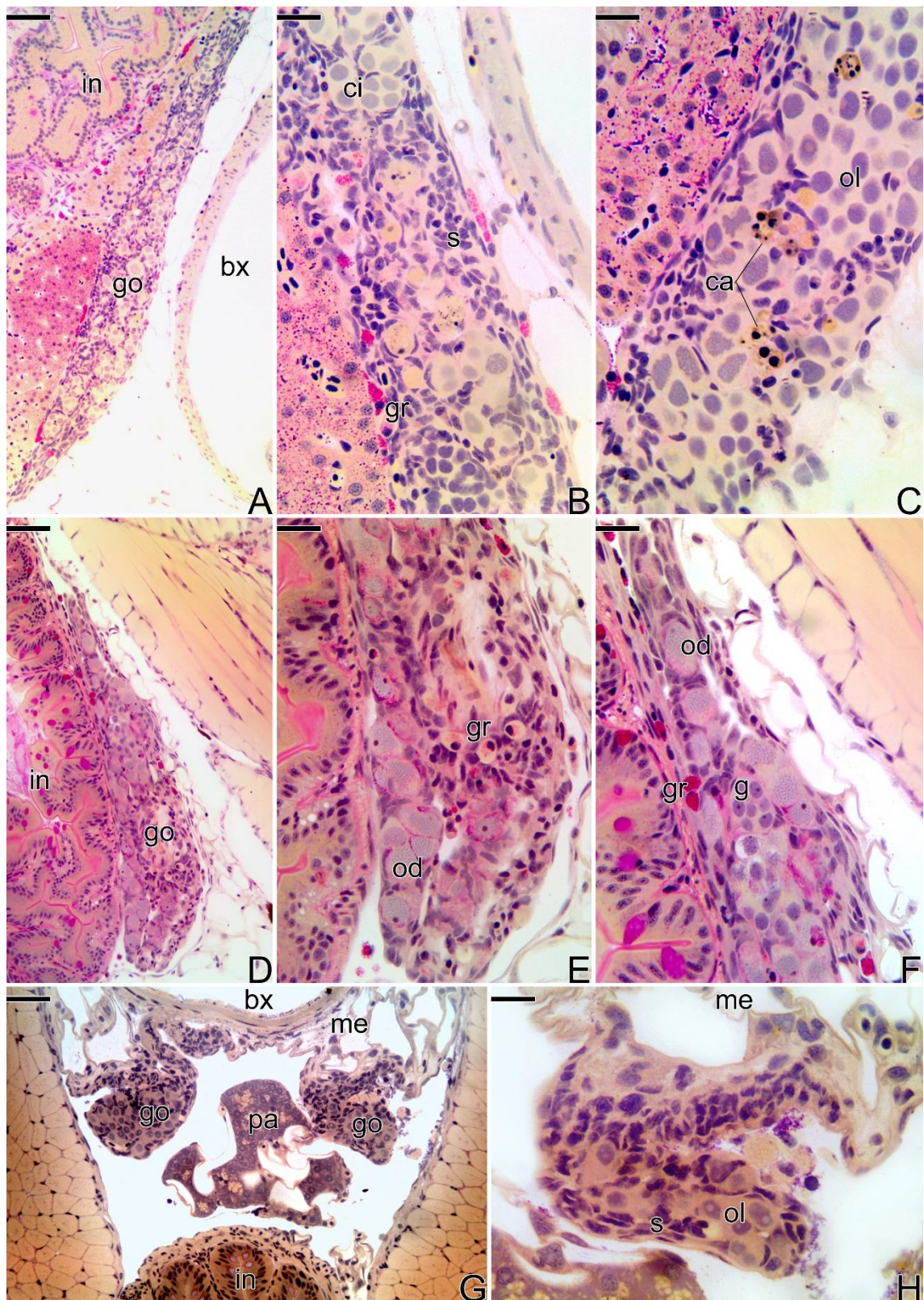


Figura 10: A-F) Cortes sagitais mostrando o processo de diferenciação da gônada supostamente masculina de *Danio rerio* (14-16dpf), que passa por uma completa remodelação tecidual. Notar o aumento de células somáticas, infiltração de granulócitos, desorganização estrutural do tecido gonadal e presença de corpos apoptóticos. G-H) Corte transversal da gônada supostamente masculina. in: intestino, bx: bexiga natatória, s: célula somática, ci: cisto germinativo, go: gônada, gr: granulócito, ca: corpos apoptóticos, ol: oócito leptotênico, od: oócito diplotênico, g: gônias, me: mesentério, pa: pâncreas. Coloração: MY. Barra: 50µm (A), 20µm (B,C,E,F,H), 40µm (D,G).

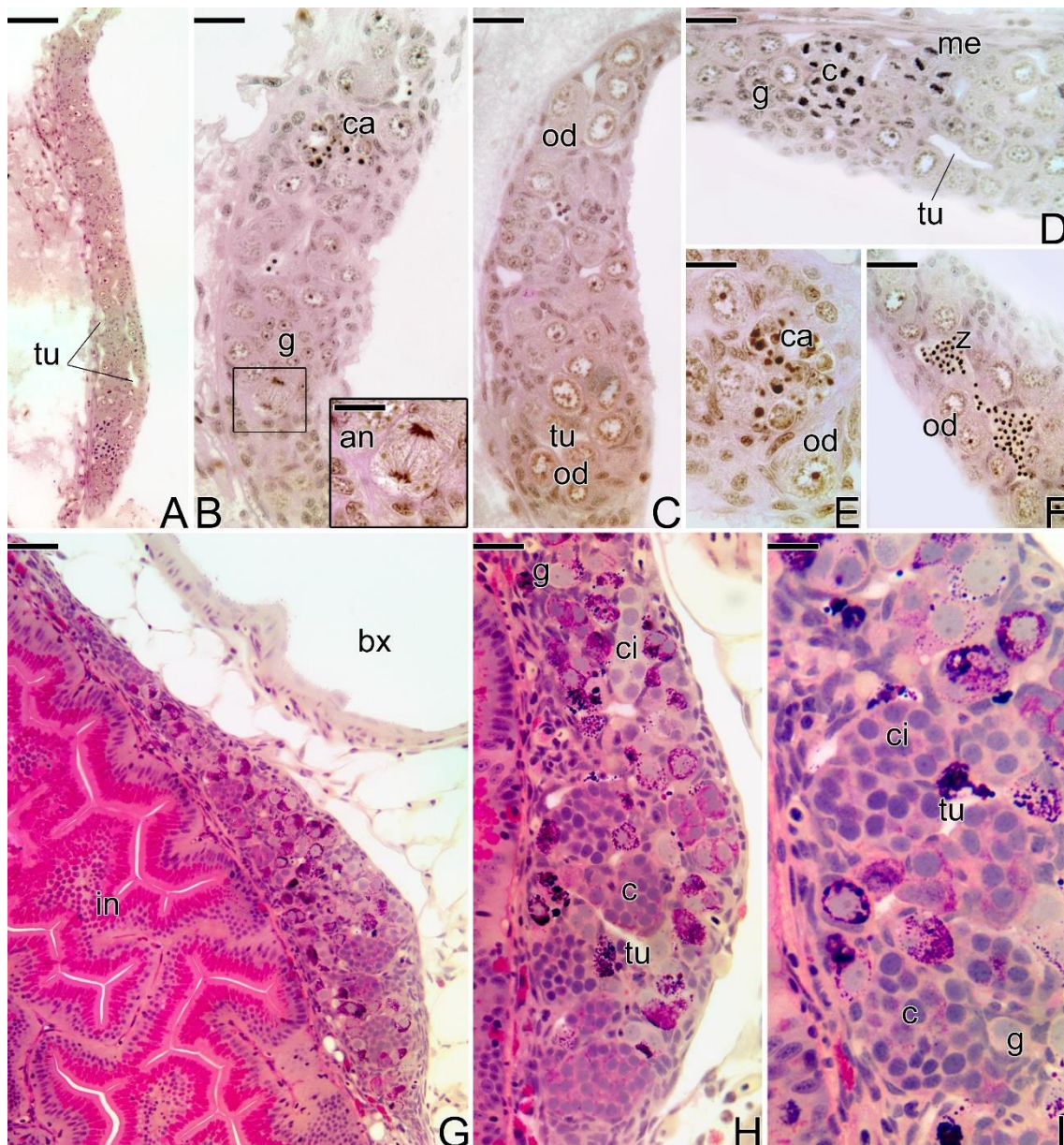


Figura 11: A-F) Cortes sagitais da gônada de *Danio rerio* (18-20dpf), em processo de transição, mostrando uma fase de intersexo. Notar a presença de espermatozoides e de oócitos em uma mesma gônada. G-I) Cortes sagitais da gônada de *Danio rerio* (20-22dpf), após adquirir as características de uma gônada masculina. Nota a grande quantidade de cistos de espermatócitos. tu: túbulo testicular, ca: corpos apoptóticos, g: gônias; na: anáfase, od: oócito diplotênico, c: espermatócitos, me: metáfase, z: espermatóides, bx: bexiga natatória, in: intestino, ci: cistos. Coloração: MY. Barra: 50µm (A), 20µm (B,F,I), 10µm (B-inset), 25µm (C,D,E), 80µm (G), 40µm (H).

A espermatogênese progride e, aos 28dpf, nota-se a presença dos primeiros espermatozoides preenchendo o compartimento luminal (Fig. 12A-B). Entre 40 e 50dpf, ocorre desenvolvimento do testículo, o qual passa a apresentar um maior número de células germinativas, entre estas, espermatogônias, espermatócitos e um maior número de espermatozoides (Fig. 12C,D). Aos 60dpf, os indivíduos masculinos já produzem uma grande

quantidade de espermatozoides que preenchem todo o lúmen dos túbulos testiculares (Fig. 12E,F). Estes túbulos tornam-se anastomosados e apresentam um epitélio descontínuo, formado, principalmente, por cistos de espermatogônias (Fig. 12E,F).

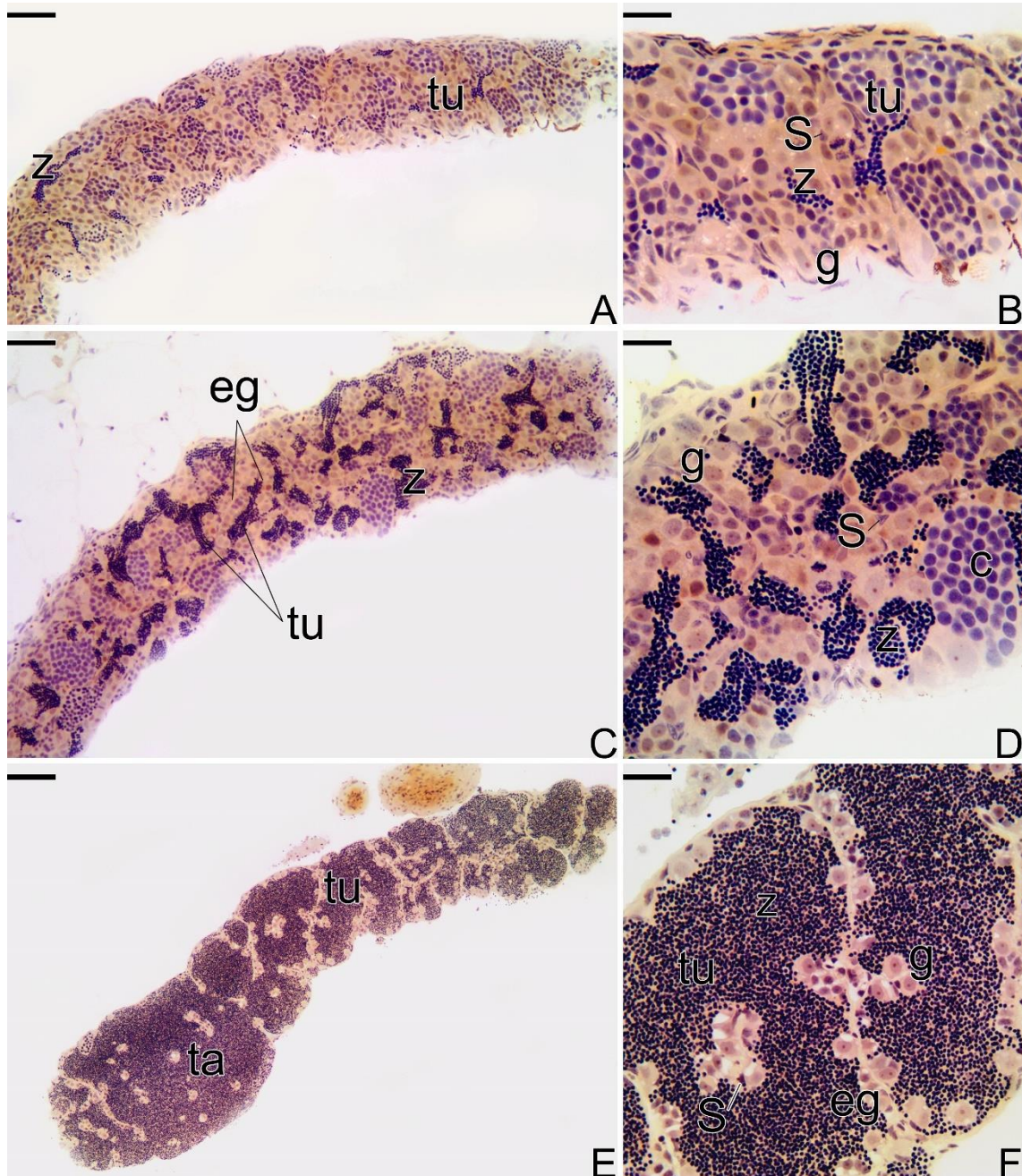


Figura 12: Cortes sagitais de testículos de *Danio rerio*, mostrando o desenvolvimento da gônada, progressão da espermatogênese e produção de espermatozoides em indivíduos com 28dpf (A,B), 50dpf (C,D) e 60dpf (E,F). tu: túbulos testiculares, z: espermatozoides, S: célula de Sertoli, g: espermatogônia, eg: epitélio germinativo, c: espermatócitos. Coloração: MY. Barra: 50µm (A,C,E), 15µm (B,D,F).

Não foram encontradas diferenças significativas nos tecidos gonadais masculinos de quaisquer indivíduos dos grupos experimentais 1, 2 e 3 (Fig. 13A,B) quando comparados ao Grupo Controle. Entretanto, no Grupo 1, alguns indivíduos apresentaram epitélio germinativo pouco organizado (Fig. 13C,D).

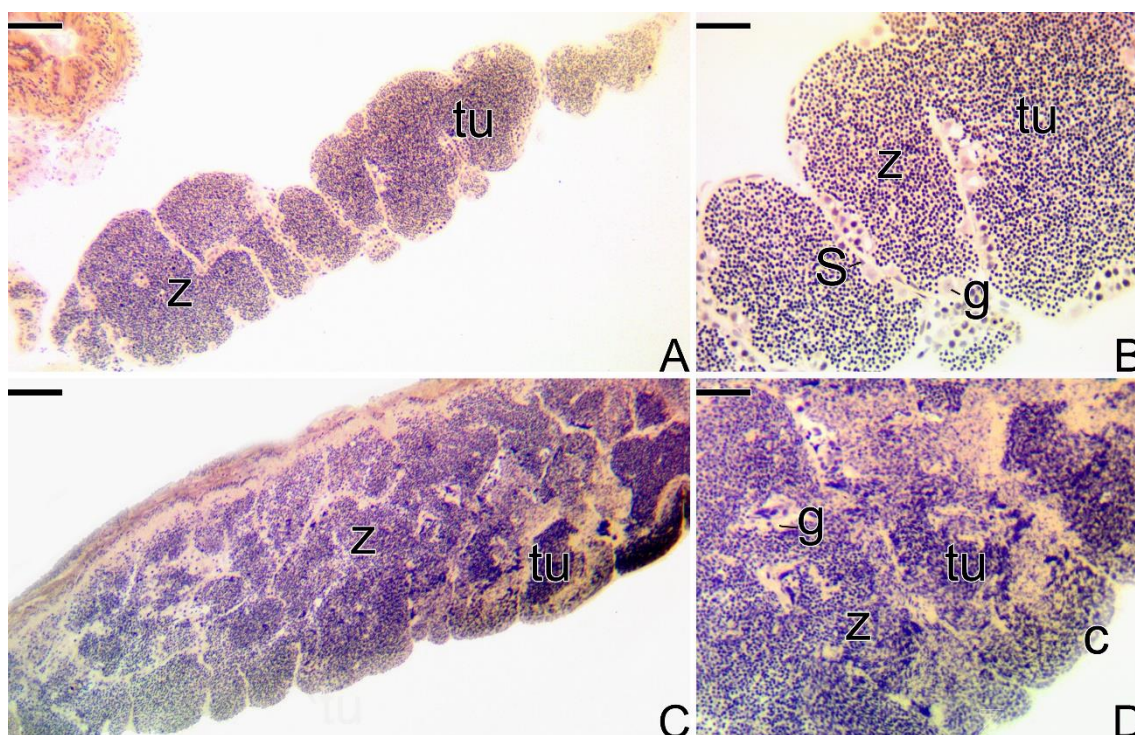


Figura 13: A-B) Cortes longitudinais de testículos de *Danio rerio*, mostrando o epitélio germinativo totalmente estabelecido e a produção de espermatozoides em indivíduos com 60dpf nos Grupos 1, 2 e 3 C-D) Cortes sagitais de testículos de *Danio rerio*, mostrando o epitélio germinativo desorganizado em indivíduos com 60dpf no Grupo 1. tu: túbulos testiculares, z: espermatozoides, S: célula de Sertoli, g: espermatogônia. Coloração: MY. Barra: 80µm (A,C), 25µm (B,D).

5.3. O Compartimento Intersticial e o Compartimento Germinativo

Em *Danio rerio*, o compartimento germinativo é separado do compartimento intersticial desde as primeiras etapas da diferenciação gonadal feminina (Fig. 14A-D), independente do grupo analisado. A membrana basal é produzida gradativamente e de forma pontual pelas células somáticas, pré-foliculares (Fig. 14A,B). Assim, sob cada célula pré-folicular, nota-se a formação de pequenos segmentos de membrana basal, que, posteriormente, ao se unirem, circundam completamente o cisto germinativo (Fig. 14C,D). Dessa forma, os componentes germinativos, constituídos por cistos de oogônias e oócitos profásicos, são individualizados pela membrana basal em vários conjuntos distintos ao longo do tecido gonadal. Posteriormente, durante a

formação do folículo ovariano, a membrana basal é sintetizada gradativamente individualizando cada folículo (Fig. 14E,F).

Já no tecido gonadal supostamente masculino, a membrana basal está ausente nos tecidos gonadais que apresentam características morfológicas femininas (Fig. 14G), bem como durante a remodelação gonadal para uma gônada masculina (Fig. 14H-K). A membrana basal forma-se gradualmente e é estabelecida somente após a diferenciação testicular ocorrer e o epitélio germinativo masculino estar totalmente estabelecido (Fig. 14L). É sintetizada ao redor dos túbulos testiculares de forma contínua ou incompleta, nas regiões em que ocorrerão anastomoses (Fig. 14M,N).

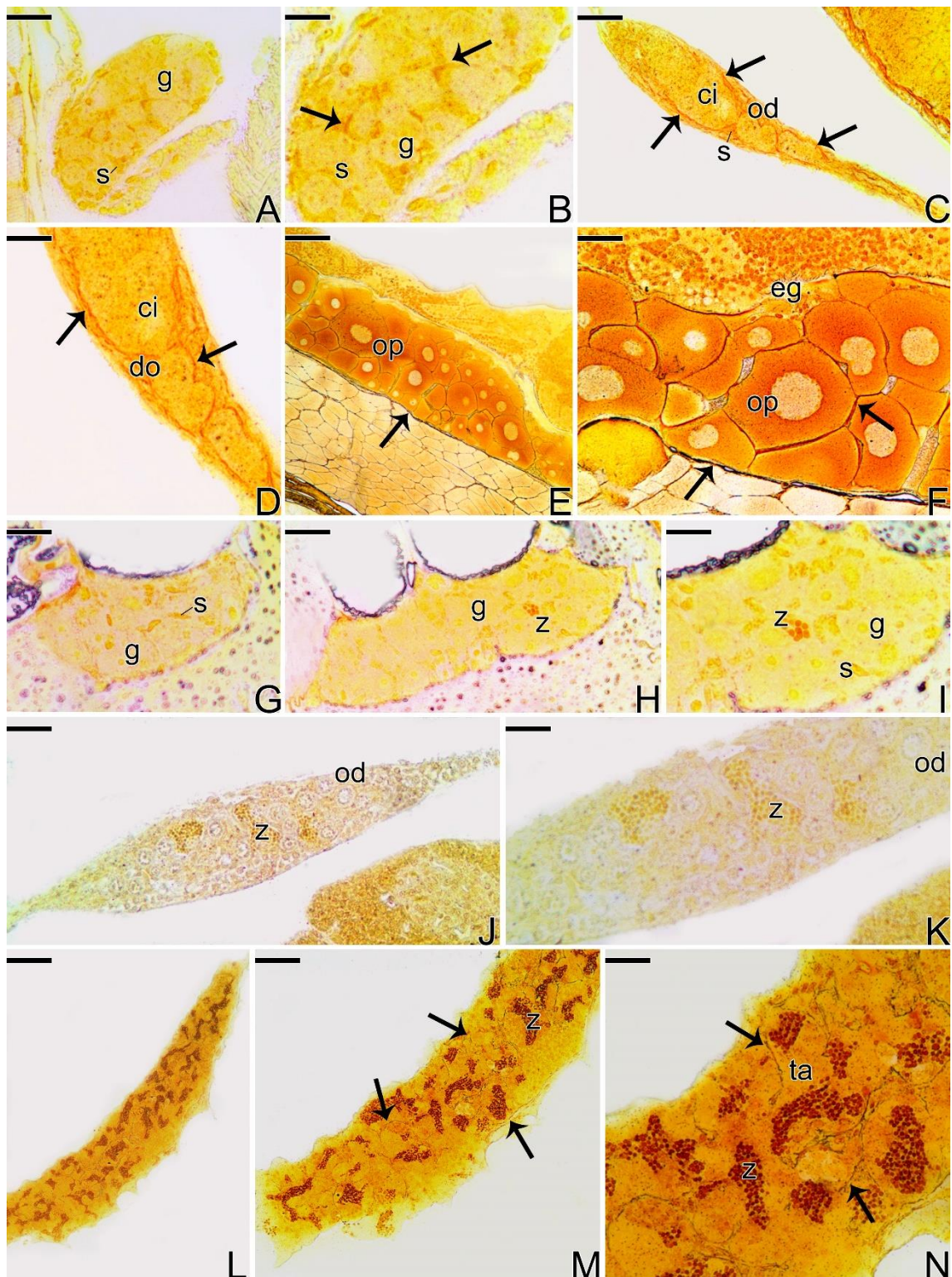


Figura 14: Cortes histológicos das gônadas de *Danio rerio*, mostrando a formação da membrana basal em gônadas femininas (A-F) e gônadas masculinas (G-N). Notar que nas gônadas femininas, a membrana basal começa a ser sintetizada já nas primeiras etapas da diferenciação, enquanto que as gônadas masculinas apresentam uma membrana basal definida somente após o total estabelecimento da gônada em um testículo. g: gônias, s: célula somática, ci: cistos germinativos, od: oócito diplotênico, op: oócito em crescimento primário, eg: epitélio germinativo, z: espermatozoides, ta: túbulos testiculares anastomosados, seta: membrana basal. Coloração: MR. Barra: 20µm (A,D,G,H,K), 10µm (B,I), 30µm (C), 50µm (E,M), 25µm (F,N), 40µm (J), 80µm (L).

5.4. Detecção de Proteínas por Imunohistoquímica durante a Remodelação Gonadal

5.4.1. Detecção das Metaloproteinases de Matriz MMP-9, MMP-2 e MMP-14

A presença de 3 tipos de Metaloproteinases de Matriz (MMP-9, MMP-2 e MMP-14) foi observada durante diferentes etapas da remodelação gonadal, em gônadas em transição de *Danio rerio* (Figs. 15 e 16) do Grupo Controle e de 31%, 33% e 56% dos indivíduos do Grupo 1, 2 e 3, respectivamente, durante o período de 16 a 20dpf.

Os indivíduos, de todos os grupos, que não sofreram remodelação gonadal neste período, apresentaram tecido gonadal com características femininas e não houve detecção de nenhum tipo de MMPs.

No início da transição gonadal (18dpf), cistos germinativos do tecido gonadal supostamente masculino, que ainda apresentava características femininas, mostraram uma resposta positiva à detecção da enzima MMP-9, enquanto que as demais células somáticas, epiteliais ou intersticiais não apresentaram qualquer tipo de resposta (Fig. 15A). Já a MMP-14 foi detectada em algumas poucas células germinativas (oócitos profásicos) e em algumas células somáticas ao redor dos cistos (Fig. 15B,C). A marcação para MMP-2 foi positiva junto às células que apresentavam corpos apoptóticos (Fig. 15D,E).

Aos 19dpf, a gônada tornou-se mais desorganizada (Fig. 15F) com a presença ainda de corpos apoptóticos e oócitos diplotênicos (Fig. 15G). Nesta etapa, a MMP-2 foi detectada no espaço intersticial (Fig. 15F), bem como em algumas células intersticiais (Fig. 15H,J). Os oócitos diplotênicos apresentaram marcação para a enzima MMP-9 (Fig. 15G,I).

Com a formação dos primeiros túbulos testiculares, a gônada que ainda apresentava alguns oócitos diplotênicos, teve resposta positiva à MMP-9, tanto em cistos de espermatogônias, como em regiões de corpos apoptóticos (Fig. 16A,B). Já a MMP-14 foi detectada em células somáticas (pré-Sertoli), que delimitam a luz do túbulo testicular (Fig. 16C,D). Ainda na mesma etapa de remodelação gonadal, foi detectada a presença da MMP-2 no compartimento intersticial, bem como em algumas células somáticas, foliculares, ao redor dos oócitos diplotênicos (Fig. 16E,F). Após a diferenciação total da gônada em um testículo, apenas a MMP-9 foi detectada em alguns granulócitos (Fig. 16G,H) no

Grupo Controle, 2 e 3. Já no Grupo 1, em alguns testículos com epitélio desorganizado, nenhuma das MMPs foram detectadas em qualquer tipo celular (dados não mostrados).

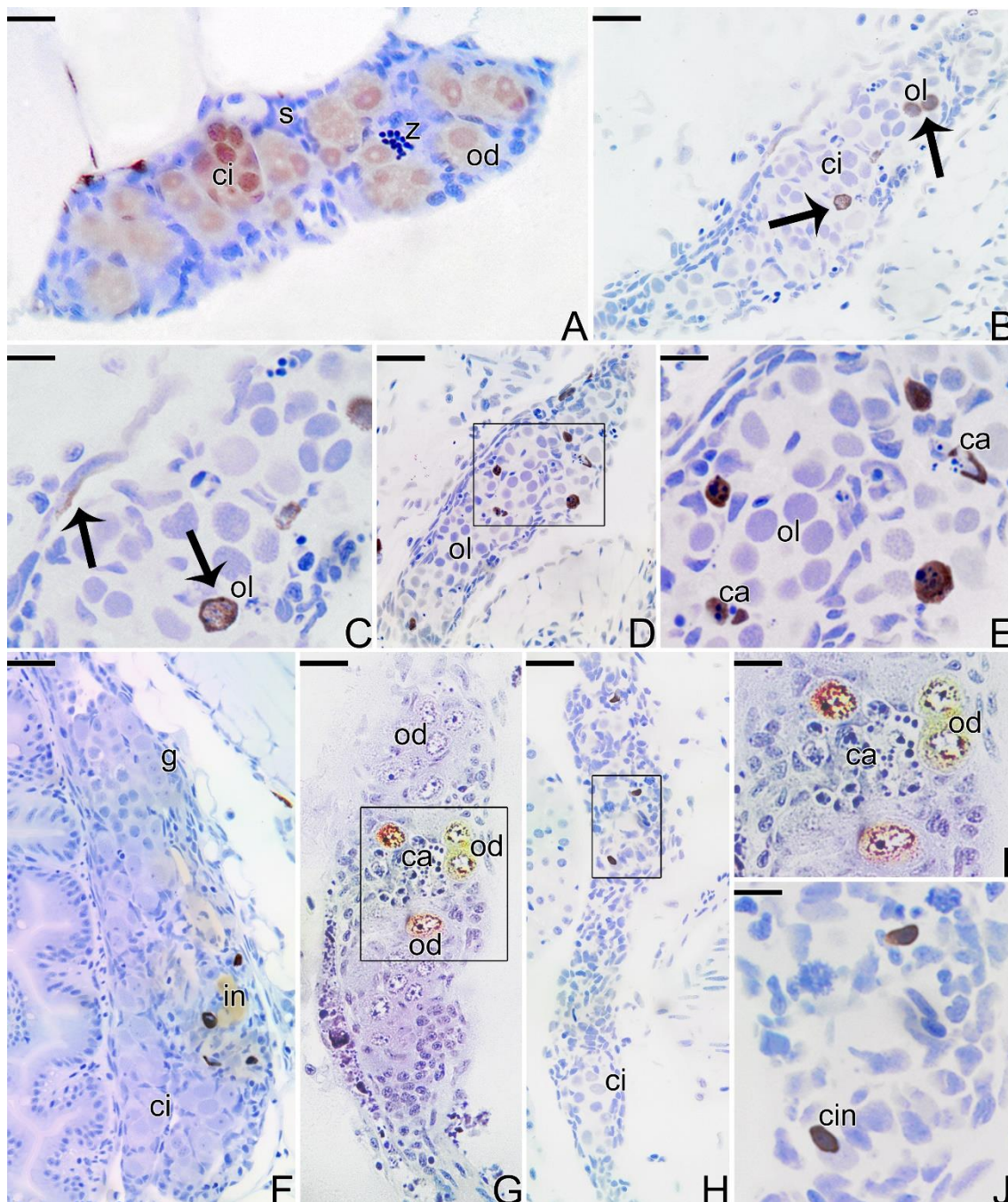


Figura 15: Imunohistoquímica para detecção das metaloproteínas MMP-9 (A, G e I), MMP-14 (B e C) e MMP-2 (D, E, F, H e J) nas gônadas em processo de transição de *Danio rerio*. ci: cistos germinativos, s: célula somática, z: espermatozoides, od: oócito diplotênico, ol: oócito leptotênico, ca: corpos apoptóticos, g: gônias, cin: células intersticiais, in: interstício, seta: regiões imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 15µm (A,I), 20µm (B,F), 10µm (C,E,J), 25µm (D,G,H).

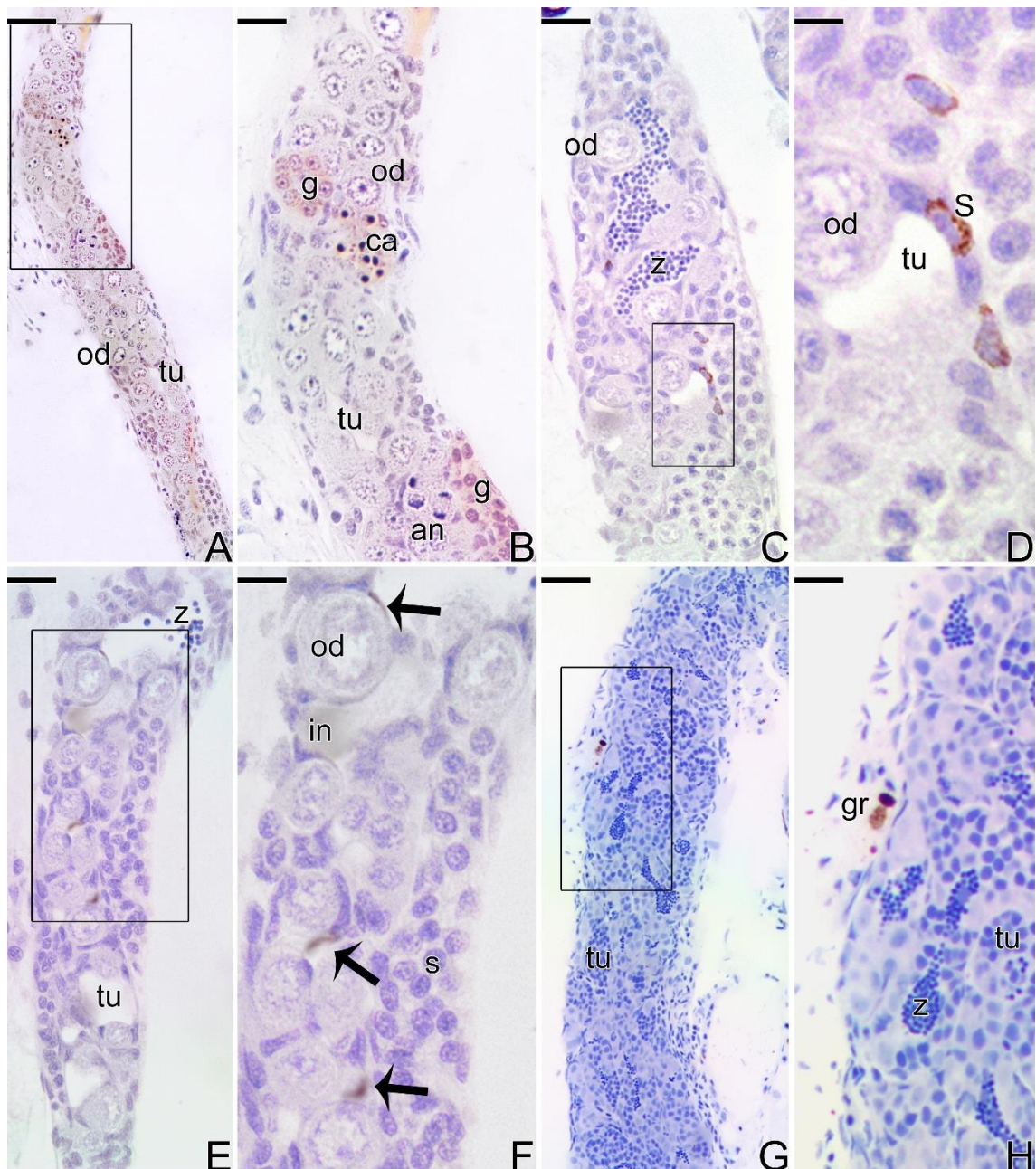


Figura 16: Imunohistoquímica para detecção das metaloproteinases MMP-9 (A, B, G e H), MMP-14 (C e D) e MMP-2 (E e F) nas gônadas em fase de intersexo (A-F) e no testículo já diferenciado (G e H). Notar a queda da expressão das MMPs ao longo do processo de diferenciação. tu: túbulos testiculares, z: espermatozoides, od: oócito diplotênico, ca: corpos apoptóticos, g: espermatogônias, S: célula de Sertoli, in: interstício, gr: granulócito, seta: regiões imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 50µm (A,G), 25µm (B,C,E), 10µm (D,F), 20µm (H).

5.5. Zimografia *in situ*

Cortes histológicos do tecido gonadal feminino de *Danio rerio* de todos os grupos, com 20dpf, foram submetidos à zimografia *in situ* para detecção da atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9 (Fig. 17). Os ovários do Grupo Controle responderam positivamente à atividade gelatinolítica. Em indivíduos do

Grupo 1, a atividade das gelatinases não foi detectada. No Grupo 2, os ovários apresentaram atividade gelatinolítica diminuída. Já no Grupo 3, foi detectada atividade em células somáticas e gaméticas, assim como no Grupo Controle (em verde). Tecidos gonadais femininos de indivíduos com a mesma idade (20dpf) do Grupo Controle, que receberam EDTA em seu substrato de incubação (controle negativo), também apresentaram atividade gelatinolítica diminuída.

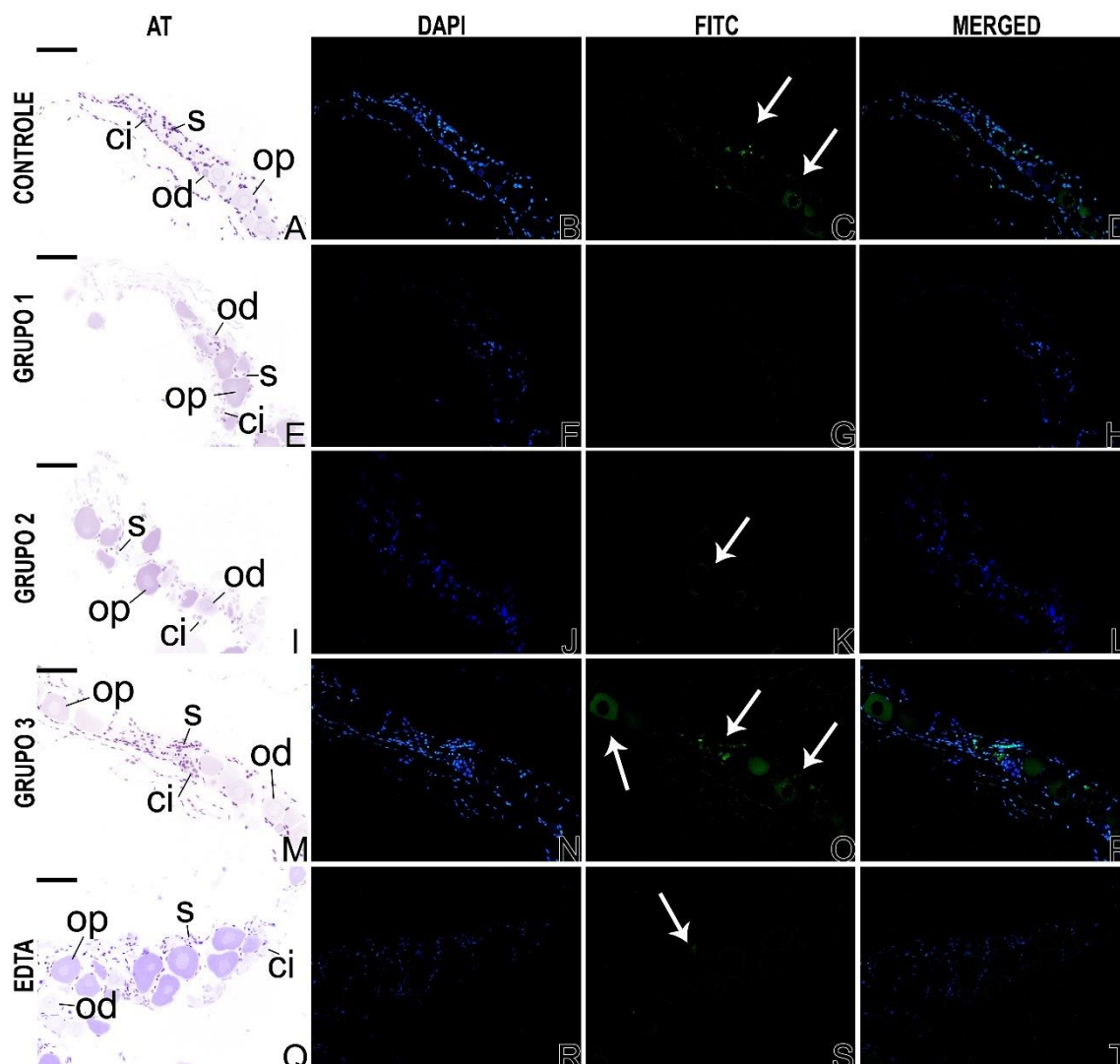


Figura 17: Atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) no tecido gonadal do *Danio rerio* (20dpf). Zimografia *in situ* do tecido gonadal usando substrato de gelatina DQ, nos diferentes grupos experimentais e com EDTA (controle negativo). A fluorescência verde (FITC) mostra a atividade gelatinolítica, enquanto os núcleos são mostrados em azul (DAPI). A primeira coluna mostra os ovários corados em Azul de Toluidina (AT) para observação da morfologia geral. od: oócito diplotênico, op: oócito em crescimento primário, s: célula somática, ci: cistos germinativos, seta: atividade de gelatinase. Barra: 80µm.

Os ovários de animais com 30dpf também foram submetidos à zimografia *in situ* (Fig. 18). Os ovários do Grupo Controle e do Grupo 3 responderam

positivamente à atividade gelatinolítica. Em indivíduos do Grupo 1 e do Grupo 2, a atividade das gelatinases foi bastante diminuída. Tecidos gonadais femininos de indivíduos com a mesma idade (30dpf) do Grupo Controle, que receberam EDTA em seu substrato de incubação (controle negativo), também apresentaram atividade gelatinolítica diminuída.

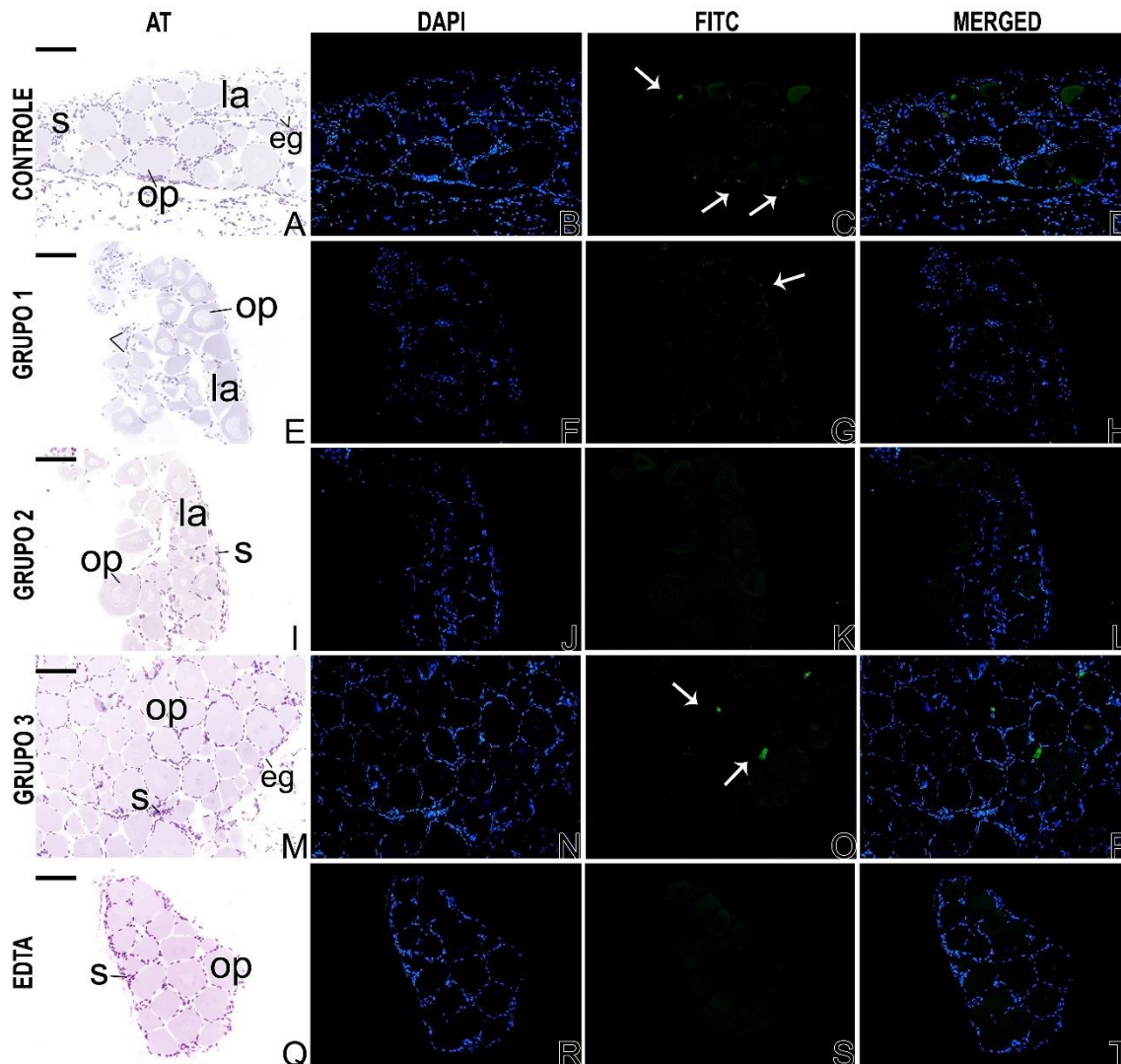


Figura 18: Atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) no tecido gonadal do *Danio rerio* (30dpf). Zimografia *in situ* do tecido gonadal usando substrato de gelatina DQ, nos diferentes grupos experimentais e com EDTA (controle negativo). A fluorescência verde (FITC) mostra a atividade gelatinolítica, enquanto os núcleos são mostrados em azul (DAPI). A primeira coluna mostra os ovários corados em Azul de Toluidina (AT) para observação da morfologia geral. la: lamela ovígera, op: oócito em crescimento primário, s: célula somática, eg: epitélio germinativo, seta: atividade de gelatinase. Barra: 80µm.

5.6. Variação do pH

A variação do pH ao longo do experimento foi demonstrada na Figura 19. Após 24h de exposição, o pH dos aquários dos três grupos experimentais expostos aos compostos naturais diminuiu. O pH do Grupo Controle tornou-se mais alto durante as primeiras 48h, diminuindo após este período. O pH dos aquários submetidos à exposição aos compostos naturais (G1, G2 e G3) manteve-se durante todo o período abaixo do pH do Grupo Controle. Entretanto, somente o G1 apresentou diferença significativa quando comparado ao Grupo Controle. Embora tenham ocorrido alguns picos durante o experimento, o pH em todos os grupos apresentou uma queda considerável, sendo mais brusca no G1.

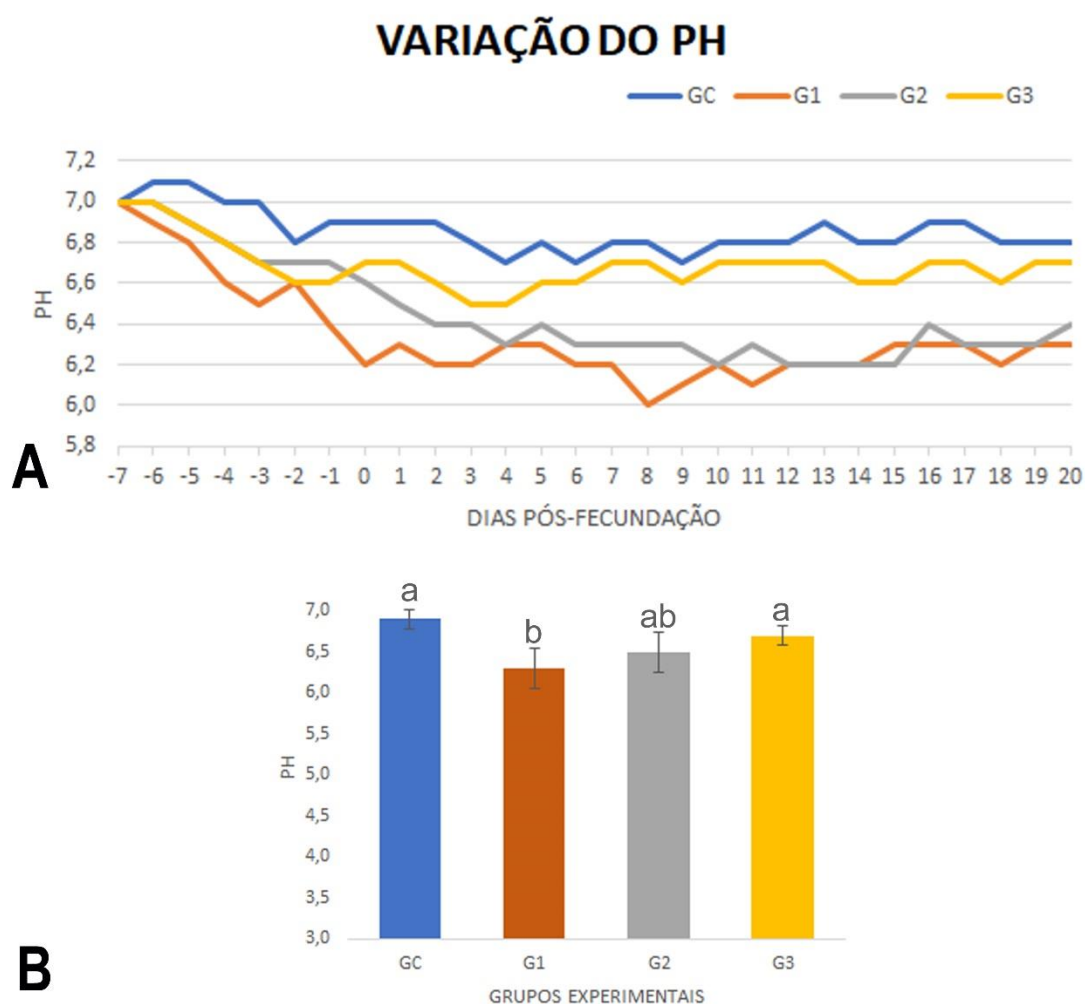


Figura 19: Comparação dos valores de pH entre o Grupo Controle (GC) e os Grupos Experimentais G1, G2 e G3. A) Variação do pH durante o período de exposição aos compostos naturais (dos 7 dias antecedentes à fecundação (-7 a 0) e até 20 dias pós-fecundação). B) Média ($\pm$ desvio padrão) do pH em cada grupo experimental durante o período de exposição mostrado em A. Diferentes letras denotam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Legenda: GC (Grupo Controle); G1 (Grupo 1 - tintura de *Camellia senensis*); G2 (Grupo 2 - tintura de *Bauhinia* sp.) e G3 (Grupo 3 - pedaços de tronco da árvore pata-de-vaca).

5.7. Histologia Hepática

Em todos os grupos experimentais, o tecido hepático de fêmeas, machos e hermafroditas de 20dpf apresentou morfologia compatível aos fígados do Grupo Controle, com grande quantidade de grânulos de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos, intensamente marcados com PAS (Fig. 20). Não foram observadas alterações quanto à conformação histológica dos cordões hepáticos, parênquima ou sinusoides em nenhum dos indivíduos. Sinais de esteatose, degeneração ou alterações na vesícula biliar não foram observadas.

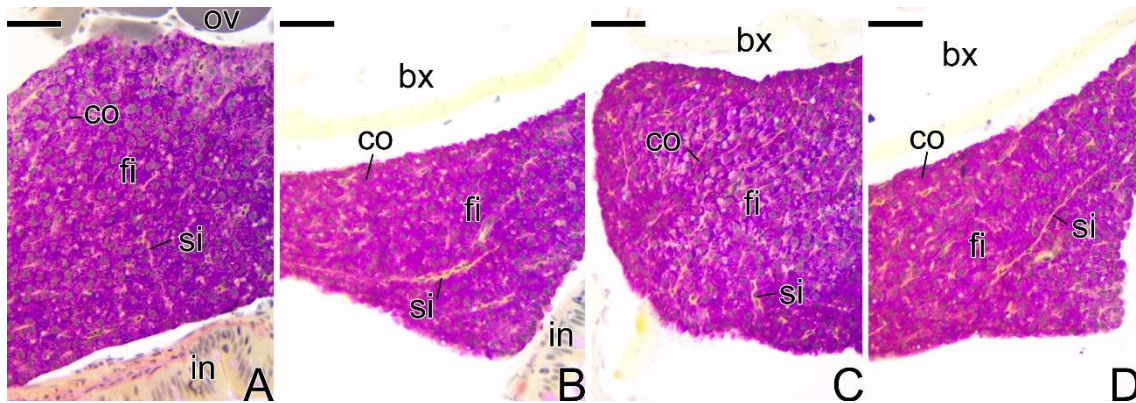


Figura 20: Cortes histológicos dos fígados de *Danio rerio* durante o período de hermafroditismo juvenil (20dpf). fi: fígado, co: cordão hepático, si: sinusoide, in: intestino, ov: ovário, bx: bexiga natatória. Coloração: MY. Barra: 30µm.

6. DISCUSSÃO

6.1. Remodelação Gonadal

Até o presente momento, não há relatos da descrição detalhada sobre a formação do epitélio germinativo e do compartimento intersticial em *Danio rerio*, tampouco a ação das MMPs na inversão sexual durante o hermafroditismo juvenil. Em *Danio rerio*, esse mecanismo de inversão sexual é caracterizado pela degeneração do tecido gonadal correspondente ao primeiro sexo, seguido pela substituição, desenvolvimento e maturação do tecido germinativo do sexo oposto, havendo sempre um período correspondente a uma fase de intersexo, conforme visto em outras espécies (Devlin e Nagahama, 2002; Uchida et al., 2002; Mazzoni et al., 2015, 2018). Isso mostra a alta bipotencialidade das células germinativas, as quais permanecem indiferenciadas até que sejam expostas a influências hormonais que induzem a sua diferenciação em oogônias ou espermatogônias (Devlin e Nagahama, 2002; Mazzoni et al., 2015) ou mesmo a fatores externos, como a presença dos compostos aqui utilizados, que diminuíram a proporção de machos e fêmeas nos grupos tratados, especialmente em G1 e G2 em relação ao Grupo Controle.

No presente estudo ficou claro que a membrana basal é uma estrutura fundamental no estabelecimento do epitélio germinativo e gônadas supostamente femininas ou masculinas podem ser distinguidas precocemente pela presença ou ausência desta membrana basal, que segrega os compartimentos germinativo e intersticial, conforme também relatado para o Characidae *Gymnocorymbus ternetzi* durante seu desenvolvimento gonocórico indireto (Mazzoni et al., 2015). Apesar do fato de ambos os indivíduos (geneticamente machos e fêmeas) terem tecidos ovarianos morfológicamente idênticos, os dados obtidos pelo Método de Reticulina permitiu distinguir dois padrões de formação da membrana basal entre fêmeas (que apresentam desenvolvimento da membrana basal) e machos (que não apresentam desenvolvimento da membrana basal nas primeiras etapas da diferenciação gonadal).

A membrana basal é uma fina camada de matriz extracelular, que separa as células epiteliais do tecido conjuntivo subjacente, e é responsável pela manutenção da integridade do tecido e prevenção da morte celular inadequada (Domogatskaya et al., 2012). Dentre as suas muitas funções, também é

responsável por estabelecer a polaridade celular, induzir a proliferação e diferenciação celular e constitui uma barreira estrutural contra a invasão de células indesejáveis (Crouch et al., 1996). Neste sentido, as MMPs parecem ter um papel importante na diferenciação sexual de *Danio rerio*, uma vez que sua detecção coincide com as gônadas nas quais não há membrana basal evidente.

Nos indivíduos geneticamente femininos de *Danio rerio*, os eventos da diferenciação gonadal são bastante semelhantes a outros Teleostei (Devlin e Nagahama, 2002; Mazzoni e Quagio-Grassiotto, 2017). Durante o desenvolvimento do ovário, os cistos de oogônias e de oócitos profásicos dão origem aos oócitos em crescimento primário. As lamelas ovígeras desenvolvem-se e o estroma ovariano diferencia-se. Ao ser sintetizada já nas primeiras etapas da diferenciação gonadal, a membrana basal segrega o compartimento germinativo dos componentes intersticiais, e posteriormente, suporta o epitélio germinativo já diferenciado (Mazzoni et al., 2010). Já nos indivíduos geneticamente masculinos de *Danio rerio*, a membrana basal é sintetizada tardiamente, somente após o total estabelecimento do epitélio germinativo masculino, quando as metalproteinases deixam de ser detectadas. Nas gônadas em transição, a membrana basal está completamente ausente, quando observada à microscopia de luz. Coincidentemente nesta etapa, há uma grande remodelação do tecido gonadal, incluindo altas taxas de apoptose de oócitos e detecção de MMPs, especialmente nas células gaméticas femininas. Uchida e colaboradores (2002, 2004) também relataram a diminuição e desaparecimento de oócitos em gônadas em transição de *Danio rerio* através do mecanismo de apoptose e dados semelhantes foram descritos durante o hermafroditismo juvenil de *Gymnocorymbus ternetzi* (Mazzoni et al., 2015). Uma vez que a membrana basal em tecidos gonadais masculinos passa a ser sintetizada, coincidindo com a inativação das MMPs, é provável que tais enzimas estejam envolvidas neste processo de diferenciação gonadal em *Danio rerio*.

6.2. Expressão das Metaloproteinases durante a Inversão Sexual

A matriz extracelular regula processos básicos nos tecidos e sua manutenção por ação das MMPs contribui para movimentação, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (Lukashev e Werb, 1998 para revisão). Em outras palavras, as MMPs desempenham um papel de extrema importância na

manutenção dos tecidos de vertebrados, entre eles, os peixes, conforme verificado neste estudo, nas gônadas em remodelação. Nos vertebrados, muitas das MMPs existentes são consideradas como um componente constitutivo de fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, em condições normais, sendo expressas de acordo com a necessidade do tecido em que se encontram (Hippis et al., 1991).

Em Teleostei, os dados sobre a atuação das MMPs nas gônadas são escassos, porém Chaves-Pozo e colaboradores (2008) constataram que estas MMPs são expressas tanto por células germinativas como por células somáticas, durante o ciclo reprodutivo masculino e feminino. Esse mesmo mecanismo ocorre durante a reversão de sexo, quando ocorre remodelação gonadal em animais adultos (Mazzoni et al., 2018). Estudos sobre a atuação das MMPs em machos de Teleostei também foram descritos por Santana e Quagio-Grassiotto (2014), mostrando que os fibroblastos podem ser as principais células responsáveis pela produção e secreção de MMP-2 no compartimento intersticial dos peixes, participando ativamente das alterações que ocorrem na gônada, durante o ciclo reprodutivo.

Neste aspecto, as mudanças do compartimento intersticial em gônadas de Teleostei são ainda mais intensas em animais que apresentam inversão de sexo, na qual há uma enorme remodelação do tecido gonadal, especialmente nos componentes intersticiais, que desmontam uma estrutura inicial para reconstruir uma nova arquitetura gonadal constituída de um sexo oposto ao de origem. No presente estudo, essa remodelação gonadal, foi resultado, ao menos em parte, da ação das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, ativadas por uma terceira metaloproteinase de membrana, a MMP-14.

Embora esses três tipos distintos de MMPs tenham sido detectados durante a remodelação gonadal em todos os grupos aqui analisados, houve uma queda significativa no número de animais que sofreram remodelação gonadal, tanto no Grupo 1, quanto no Grupo 2, diminuindo a quantidade de machos nestes grupos. Isso se deve ao fato de ter havido uma diminuição da atividade das MMPs nestes indivíduos tratados com tintura de *Camellia senensis* e *Bauhinia* sp., conforme detectado por zimografia *in situ*, mostrando ainda que *Camellia senensis* apresentou uma maior influência na remodelação. Possivelmente, a inibição das MMPs tenha impedido a reversão de parte da população feminina em masculina.

Contudo, no grupo em que a aplicação do composto natural se deu através da introdução de troncos na água, a inibição das MMPs e consequente inibição da mudança do sexo não foi significativa, assim como no Grupo Controle.

No Grupo Controle e no Grupo 3, as metaloproteinases MMP-9 foram detectadas principalmente no citoplasma de alguns oócitos, pertencentes às gônadas em transição, ou seja, aquelas que prosseguiram para a inversão sexual (gônadas supostamente masculinas). Nas gônadas supostamente femininas, os oócitos não apresentaram resposta positiva à MMP-9. Neste tipo de tecido gonadal, a MMP-9 foi detectada em fases posteriores, nas células somáticas que promovem a formação das lamelas ovígeras. Se a MMP-9 realmente tiver um papel importante na formação das lamelas ovígeras do Grupo Controle, este pode ser um forte indício de que estas mesmas MMPs foram, de fato, inibidas, ao menos parcialmente, nos Grupos 1 e 2, os quais apresentavam ovários com lamelas ovígeras desorganizadas e pouco delimitadas, mesmo em indivíduos supostamente femininos, promovendo um atraso no estabelecimento do epitélio germinativo nestes grupos.

Em relação à metaloproteinase MMP-2, sua expressão foi menor do que a de MMP-9, em todas as etapas da remodelação gonadal de *Danio rerio*, sendo encontrada junto aos corpos apoptóticos, interstício e algumas células foliculares do Grupo Controle e Grupo 3. Neste aspecto, parece haver uma relação entre a atividade das MMPs e a constituição momentânea do tecido gonadal. Ou seja, no início do processo de remodelação, quando há uma predominância de tecido gonadal feminino, a MMP-9 mostra-se mais expressa, especialmente nos oócitos. Já ao final do processo, quando o tecido gonadal masculino torna-se predominante, a MMP-2 está presente com maior atividade, especialmente em cistos germinativos e granulócitos. Por outro lado, após o desenvolvimento total do testículo, nenhuma destas MMPs foi detectada nas células testiculares. Porém, supõe-se que se o ciclo reprodutivo masculino for acompanhado, dados semelhantes aos de Santana e Quagio-Grassiotto (2014) podem ser obtidos, uma vez que granulócitos em testículos plenamente desenvolvidos de *Danio rerio* apresentaram resposta positiva para MMP-9. Ou seja, sua atuação e expressão deve variar conforme as diferentes fases do ciclo reprodutivo.

A expressão e localização da metaloproteinase MMP-14, frequentemente coincidiu com a expressão das demais MMPs aqui estudadas. Possivelmente, a

correlação deste fato ocorre por se tratar de uma proteína transmembrana, que ativa as demais MMPs para que possam atuar sobre determinado tecido (Khokha et al., 2013).

6.3. Ação dos Compostos Naturais durante a Remodelação Gonadal

Sabe-se que os flavonoides, fitocompostos e polifenólicos encontrados em plantas, apresentam diversas atividades biológicas devido à sua capacidade de modular determinadas enzimas e receptores celulares, além de que, muitas dessas substâncias possuem a capacidade de mimetizar os TIMPs (Ribeiro et al., 2010; Dos Santos, 2013), e consequentemente influenciar a degradação da matriz extracelular. Uma vez que as MMPs participam dos processos de degeneração da matriz extracelular, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, observamos que a tintura obtida dos compostos de *Camellia sinensis* e de *Bauhinia* sp. foram hábeis em inibir a atividade das MMPs, que dessa forma impediu a modelação gonadal durante o hermafroditismo juvenil de *Danio rerio*, levando à uma inibição da inversão sexual de um número significativo de indivíduos nos Grupos 1 e 2, aumentando, assim, a porcentagem de fêmeas.

Embora a inibição das MMPs ocorra por ação de compostos naturais em doses mais elevadas, é importante ter conhecimento de que algumas espécies de plantas, muitas vezes utilizadas comumente na aquariofilia com o intuito de tentar aproximar o ambiente de confinamento do ambiente natural e até mesmo induzir a reprodução, podem ser capazes de influenciar a remodelação do tecido gonadal nos peixes e, quiçá, em algumas outras espécies aquáticas.

Os dados encontrados entre 16 a 20dpf no presente estudo, mostram que o Grupo Controle obteve a taxa de 54% de animais com hermafroditismo juvenil, coincidindo com os dados descritos na literatura (Uchida et al., 2002), em que metade da população feminina sofre remodelação tecidual, originando um tecido gonadal masculino. Nos grupos experimentais Grupo 1 e 2, a taxa de animais com hermafroditismo juvenil foi de 31 e 33%, respectivamente. Esta queda significativa na taxa de indivíduos com remodelação gonadal em relação ao Grupo Controle pode ser atribuída à ação dos compostos adicionados diariamente à água, que agiram como possíveis TIMPs. Isso explica o aumento da taxa de fêmeas aos 30 e 90dpf, nos Grupos 1 e 2, uma vez que o tecido gonadal de tais indivíduos permaneceu como feminino.

No Grupo 3 (troncos de *Bauhinia* sp.), foi encontrada a porcentagem de 56% de animais com remodelação gonadal, indicando que os compostos utilizados não foram capazes de influenciar significativamente a remodelação tecidual e a morfogênese gonadal ocorreu normalmente. Considerando que aproximadamente 50% dos animais, em condições normais, sofram remodelação tecidual, adquirindo tecido gonadal masculino (Takahashi, 1977), a introdução de troncos da espécie *Bauhinia* sp. na água não foi significativa. A explicação para este resultado pode se dar ao fato de que os compostos presentes na água (no Grupo 3) poderiam estar em menor concentração, já que os troncos foram introduzidos uma única vez no aquário ao longo do experimento, diferentemente dos Grupos 1 e 2.

A ação dos compostos naturais aqui utilizados, possivelmente, tem efeito somente durante seu período de exposição. Entretanto, o estabelecimento do epitélio germinativo ocorreu de forma definitiva, mesmo após a 20dpf, quando os animais não foram mais expostos a estes compostos. Ainda assim, as MMPs não foram capazes de causar uma nova remodelação gonadal na ausência desses possíveis TIMPs, uma vez que as porcentagens de animais com tecido gonadal feminino definitivo encontradas nos grupos experimentais 30 e 90dpf foram significativas, quando comparadas ao Grupo Controle. Nestes grupos G1 e G2, os animais permaneceram como fêmeas até atingir maturação sexual (90dpf) e não sofreram inversão sexual, comprovando que a ação dos compostos utilizados teve ação efetiva e duradoura.

Em termos econômicos, o esclarecimento dos mecanismos que regem a determinação sexual é bastante promissor para o cultivo de animais em cativeiro, uma vez que permite a manipulação e controle da sexualidade desejável para espécies de importância ornamental ou comercial (Reis et al., 2016). O desenvolvimento de novas técnicas de manejo de controle do sexo representa um grande potencial para piscicultura, permitindo o aumento da produtividade, a partir da obtenção exclusiva de um determinado sexo, o qual apresenta características morfológicas, fisiológicas e comportamentais desejáveis para um melhor cultivo.

Atualmente a manipulação fenotípica do sexo em cativeiro tem sido realizada principalmente através de cruzamentos dirigidos (Mair et al., 1997) ou da aplicação de hormônios esteroides exógenos ou de inibidores das enzimas

esteroidogênicas (Piferrer, 2001) o que possibilita a inversão/reversão do sexo do animal e consequentemente a obtenção de monossexos nas pisciculturas. Porém, apesar da existência de diversas formas de manejo, vários fatores genéticos ou ambientais podem levar à geração de indivíduos não desejáveis. Portanto, o controle reprodutivo nas pisciculturas representa ainda, em muitos aspectos, um grande desafio a ser vencido.

Além disso, apesar da utilização de hormônios ser a técnica mais comum para a produção de monossexos (Borges et al., 2005), ainda existe uma certa preocupação frente ao ambiente, quanto aos indivíduos hormonal ou geneticamente manipulados. Portanto, nossos resultados se mostram relevantes, já que o uso de compostos naturais se mostrou capaz de inibir a inversão sexual, podendo assim se tornar uma opção para substituir os hormônios que são aplicados nos peixes como estímulo para mudança de sexo (Popma & Green, 1990). Neste sentido, o uso de substâncias naturais pode ser mais vantajosa para a manipulação sexual em peixes por apresentar menos danos ambientais, embora os estudos nesta área precisem ser aprofundados.

6.4. Toxicidade Compostos Naturais

Os compostos naturais aqui utilizados, *Camellia sinensis* (chá verde) e de *Bauhinia* sp. (pata-de-vaca) são reconhecidos por apresentarem alto teor de compostos polifenólicos, reconhecidos por suas atividades anticarcinogênica, antioxidantes, antiinflamatórias e quimioprotetoras (Schmitz et al., 2005; Teixeira e Santos, 2011). Entretanto o uso contínuo e altas doses dessas substâncias podem causar graus de toxicidade tanto para o homem quanto para os animais (Martins et al., 2012). Essa citotoxicidade se dá principalmente no fígado, um dos principais órgãos metabólicos do corpo (Takabayashi et al., 2004; Schmidt et al., 2005), podendo levar à lesões hepáticas. Entretanto, em doses controladas, o risco de toxicidade torna-se menor.

No presente estudo, tanto o uso da *Camellia sinensis* como o da *Bauhinia* sp. não se mostrou tóxico aos espécimes, sejam eles adultos ou juvenis, uma vez que o tecido hepático destes animais não apresentaram lesões, conforme observado nas análises histológicas. Aparentemente, os únicos efeitos dessas substâncias foram mimetizar os TIMPs (especialmente nos Grupos 1 e 2) e diminuir o pH da água. Embora tais compostos naturais tenham diminuído o pH

da água em todos os grupos experimentais, a queda do pH não pode ser atribuída diretamente à inibição das MMPs, uma vez que no Grupo Controle também houve queda do pH. Esse dado reforça o indício de que esses compostos naturais podem ser utilizados como TIMPs (Schmitz et al., 2005) e desempenhar um papel importante na remodelação gonadal de peixes.

7. CONCLUSÃO

- As MMPs tem um papel extremamente importante na inversão do sexo dos animais, e que compostos naturais como os aqui utilizados - *Camellia sinensis* (chá verde) e *Bauhinia* sp. (pata-de-vaca) - mimetizam os TIMPs, sendo capazes de inibir a produção de MMPs e consequentemente impedir o estabelecimento do epitélio germinativo masculino em *Danio rerio*, quando utilizados em altas doses;

- A presença ou ausência da membrana basal na gônada em formação permite distinguir dois padrões de tecido gonadal que culminam com a formação de fêmeas e machos funcionais;

- É possível que as MMPs atuem diretamente no estabelecimento da membrana basal, especialmente durante o período de hermafroditismo juvenil de *Danio rerio*;

- *Camellia sinensis* (chá verde) se mostrou um composto mais eficaz que *Bauhinia* sp. ao inibir as MMPs durante a remodelação gonadal de *Danio rerio*;

- A ação dos compostos utilizados, na forma de tintura, teve ação efetiva e duradoura, indicando que a inversão sexual foi definitiva.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antoneli, F. N. (2006). Perfil morfo-funcional da inversão de sexo em *Synbranchidae* (Teleostei: Synbranchiformes).
- Baroiller, J. F., d'Cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 399-409.
- Birkedal-Hansen, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current opinion in cell biology*, 7(5), 728-735.
- Birt, D. F., Hendrich, S., Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 90(2-3), 157-177.
- Borges, A. M., Moretti, J. O. C., McManus, C., Mariante, A. D. S. (2005). Produção de populações monossexo macho de tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(2), 153-159.
- Brew, K., Dinakarpanthian, D., Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 267-283.
- Burns, J. R., Weitzman, S. H., Grier, H. J., Menezes, N. A. (1995). Internal fertilization, testis and sperm morphology in glandulocaudinae fishes (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*, 224(2), 131-145.
- Carvalho, H. F., Recco-Pimentel, S. M. (2007). A célula. 2ªed. Barueri: Manole. 380p.
- Cauty, C., Loir, M. (1995). The interstitial cells of the trout testis (*Oncorhynchus mykiss*): ultrastructural characterization and changes throughout the reproductive cycle. *Tissue and Cell*, 27(4), 383-395.
- Cesar, M.P., Murgas, L.D.S., Araújo, R.V., Drummond, C.D. (2005). Métodos para obtenção de população monossexo na piscicultura. *Boletim Agropecuário. Universidade Federal de Lavras-MG*, 69: 1-27.
- Chaves-Pozo, E., Liarte, S., Fernández-Alacid, L., Abellán, E., Meseguer, J., Mulero, V., García-Ayala, A. (2008). Pattern of expression of immune-relevant genes in the gonad of a teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Molecular immunology*, 45(10), 2998-3011.
- Chaves-Pozo, E., Mulero, V., Meseguer, J., García Ayala, A. (2005). An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biology of Reproduction*, 72(3), 593-601.

- Chaves-Pozo, E., Pelegrín, P., Mulero, V., Meseguer, J., García Ayala, A. (2003). A role for acidophilic granulocytes in the testis of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L., Teleostei). *Journal of Endocrinology*, 179(2), 165-174.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Crawford, B. D., Pilgrim, D. B. (2005). Ontogeny and regulation of matrix metalloproteinase activity in the zebrafish embryo by in vitro and in vivo zymography. *Developmental biology*, 286(2), 405-414.
- Croft, K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 435-442.
- Crouch, E. C. (1996). Basement membrane. *The lung: scientific foundations*, 53-1.
- Dammski, A. P., Müller, B. R., Gaya, C., Regonato, D. (2011). *Zebrafish-Manual de criação em Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná*, 20-1.
- De Mitcheson, Y. S., Liu, M. (2008). Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries*, 9(1), 1-43.
- De Souza, G. C., Haas, A. P. S., Von Poser, G. L., Schapoval, E. E. S., Elisabetsky, E. (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 90(1), 135-143.
- Devlin, R. H., Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3-4), 191-364.
- Domogatskaya, A., Rodin, S., Tryggvason, K. (2012). Functional diversity of laminins. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 523-553.
- Dos Santos, K. M., de Fátima Nunes, D. A., Gomes, I. N. F., de Azambuja Ribeiro, R. I. M. (2013). Caracterização e atividade de extratos de plantas de uma espécie de *Bauhinia* sobre a ação de Metaloproteinases. *BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*, 2(2esp), 20-23.
- Farmacopeia Brasileira. (2019). 6º ed. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. São Paulo: Atheneu. (Parte I, IV-7).
- Graham, H. D. (1992). Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(5), 801-805.
- Grier, H. J. (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist*, 21(2), 345-357.

- Grier, H. J. (2002). The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: *Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* (Creswell, R.L. ed.). Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium. pp. 537-552.
- Grier, H. J. (2012). Development of the follicle complex and oocyte staging in red drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). *Journal of Morphology*, 273(8), 801-829.
- Grier, H. J., Lo Nostro, F. (2000). The germinal epithelium in fish gonads: The unifying concept. In *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Biology of Fish* (pp. 233-236).
- Grier, H. J., Uribe-Aranzábal, M. C. (2009). The testis and spermatogenesis in teleosts. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)*, 8, 119-142.
- Grier, H. J., Uribe-Aranzábal, M. C., Patiño, R. (2009). The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)*, 8(Part A), 25-84.
- Hägglund, A. C., Ny, A., Leonardsson, G., Ny, T. (1999). Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Endocrinology*, 140(9), 4351-4358.
- Heemstra, P. C., Randall, J. E. (1993). Groupers of the world. *FAO Fisheries synopsis*, 16(125), I.
- Helfman, G., Collette, B. B., Facey, D. E., Bowen, B. W. (2009). *The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology*. John Wiley & Sons.
- Hernández Ángel, M., Prieto González, E. A. (1999). Plantas que contienen polifenoles: antioxidantes dentro del estilo de vida. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(1), 12-12.
- Hipps, D. S., Hembry, R. M., DochERTY, A. J., Reynolds, J. J., Murphy, G. (1991). Purification and characterisation of human 72-kDa gelatinase (type IV collagenase). Use of immunolocalisation to demonstrate the non-coordinate regulation of the 72-kDa and 95-kDa gelatinases by human fibroblasts.
- Hoar, W. S., Randall, D. J. (Eds.). (1969). *Reproduction and growth, bioluminescence, pigments, and poisons*. Academic Press.
- Hulboy, D. L., Rudolph, L. A., Matrisian, L. M. (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular human reproduction*, 3(1), 27-45.
- Janssens, E., Gaublomme, D., De Groef, L., Darras, V. M., Arckens, L., Delorme, N., Claes, F., Hove, I. V., Moons, L. (2013). Matrix metalloproteinase 14 in

the *zebrafish*: an eye on retinal and retinotectal development. *PloS one*, 8(1), e52915.

- Keow, J. Y., Herrmann, K. M., Crawford, B. D. (2011). Differential in vivo zymography: A method for observing matrix metalloproteinase activity in the *zebrafish* embryo. *Matrix Biology*, 30(3), 169-177.
- Khokha, R., Murthy, A., Weiss, A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(9), 649-665.
- Kimura, K., Cuvier, O., Hirano, T. (2001). Chromosome Condensation by a Human Condensin Complex in Xenopus Egg Extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5417-5420.
- Lambert, E., Dassé, E., Haye, B., Petitfrère, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Critical reviews in oncology/hematology*, 49(3), 187-198.
- Le Gac, F., Loir, M. (1999). Male reproductive system, fish: In E. Knobil, e JD Neill (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 20-30).
- Lieschke, G. J., Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: *zebrafish* swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353-367.
- Liu, M., De Mitcheson, Y. S. (2009). Gonad development during sexual differentiation in hatchery-produced orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) and humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae). *Aquaculture*, 287(1-2), 191-202.
- Lo Nostro, F. L. (2000). Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, synbranchidae) (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Lodi, V. M., Navarro, F. (2011). O efeito do chá verde (*Camellia Sinensis*) na redução da gordura corporal e circunferência abdominal de mulheres praticantes de Jump Fit de uma academia do município de São José-SC. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, 5(26), 4.
- Loir, M., Sourdain, P., Mendis-Handagama, S. M., Jégou, B. (1995). Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microscopy research and technique*, 32(6), 533-552.
- Longin, J., Guillaumot, P., Chauvin, M. A., Morera, A. M., Le Magueresse-Battistoni, B. (2001). MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation. *Journal of cell science*, 114(11), 2125-2134.
- Lorenzi, H., Matos, F. J. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. *Instituto Plantarum de Estudos da Flora*. 512 p.

- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a005058.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 367-389.
- Lukashev, M. E., Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in cell biology*, 8(11), 437-441.
- Madhu, R., Madhu, K., Venugopal, K. M. (2010). Sex change of hatchery produced *Amphiprion ocellaris*: Influence of mating system removal on gonad maturation and nesting success. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 52(1), 62-69.
- Mair, G. C., Abucay, J. S., Abella, T. A., Beardmore, J. A., Skibinski, D. O. F. (1997). Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(2), 396-404.
- Manfredini, V., Martins, V. D., da Silveira Benfato, M. (2013). Chá verde: Benefícios para a saúde humana. *Infarma – Ciências Farmacêuticas*, 16(9/10), 68-70.
- Martins, R. T., Almeida, D. B. D., Monteiro, F. M. D. R., Kowacs, P. A., Ramina, R. (2012). Receptores opioides até o contexto atual. *Revista Dor*, 13(1), 75-79.
- Martins, V. L., Caley, M., O'Toole, E. A. (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and Tissue Research*, 351(2), 255-268.
- Matos, F. D. A. (2000). Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. *Fortaleza: Ufc*.
- Matsubara, S., Rodriguez-Amaya, D. B. (2006). Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. *Food Science and Technology*, 26, 401-407.
- Mazzoni, T. S. (2013). Formação do epitélio germinativo e diferenciação das estruturas gonadais: uma análise comparativa entre grupos mais basais (Ostariophysi) e mais derivados (Atherinomorpha e Percomorpha) dentro de Teleostei. Tese de Doutorado. Biblioteca do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brasil, 305 p.
- Mazzoni, T. S., Quagio-Grassiotto, I. (2017). *Ovary differentiation and activity in teleostei fish*. Rijeka: InTech. pp. 129-56.
- Mazzoni, T. S., Quagio-Grassiotto, I. (2020). In totum immunostaining: A histological analysis tool for small dimensions biological samples. *International Journal of Biological & Medical Research*, 11(1), 6938-6943.

- Mazzoni, T. S., Quagio-Grassiotto, I. (2021). Presence of the matrix metalloproteinases during the migration of the primordial germ cells in zebrafish gonadal ridge. *Cell and Tissue Research*, 383(2), 707-722.
- Mazzoni, T. S., Grier, H. J., Quagio-Grassiotto, I. (2010). Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 293(9), 1581-1606.
- Mazzoni, T. S., Grier, H. J., Quagio-Grassiotto, I. (2014). Male gonadal differentiation and the paedomorphic evolution of the testis in Teleostei. *The Anatomical Record*, 297(6), 1137-1162.
- Mazzoni, T. S., Grier, H. J., Quagio-Grassiotto, I. (2015). The basement membrane and the sex establishment in the juvenile hermaphroditism during gonadal differentiation of the *Gymnocorymbus ternetzi* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *The Anatomical Record*, 298(12), 1984-2010.
- Mazzoni, T. S., Lo Nostro, F. L., Antoneli, F. N., Quagio-Grassiotto, I. (2018). Action of the metalloproteinases in gonadal remodeling during sex reversal in the sequential hermaphroditism of the teleostei fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchiformes: Synbranchidae). *Cells*, 7(5), 34.
- Meijide, F. J., Rey Vázquez, G., Grier, H. J., Lo Nostro, F. L., Guerrero, G. A. (2016). Development of the germinal epithelium and early folliculogenesis during ovarian morphogenesis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Acta Zoologica*, 97(1), 18-33.
- Miura, S., Komatsu, T., Higa, M., Bhandari, R. K., Nakamura, S., Nakamura, M. (2003). Gonadal sex differentiation in protandrous anemone fish, *Amphiprion clarkii*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1), 165-166.
- Miyazaki, S. F. (2008). Utilização do chá verde em cosméticos. *Cadernos de Prospecção*, 1(1), 10-13.
- Mylonas, C. C., Zohar, Y. (2000). Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, 10(4), 463-491.
- Nagahama, Y. (1983). 6 The Functional Morphology of Teleost Gonads. *Fish physiology*, 9, 223-275.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T., e Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 362-372.
- Nakamura, S., Aoki, Y., Saito, D., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., e Tanaka, M. (2008). Sox9b/sox9a2-EGFP transgenic medaka reveals the morphological reorganization of the gonads and a common precursor of both the female and male supporting cells. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(3), 472-476.

- Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S. I., Tanaka, M. (2010). Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost *medaka*. *Science*, 328(5985), 1561-1563
- Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C., Pavanelli, C. S. (2001). Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação [Freshwater fish eggs and larvae: development and identification manual]. *EDUEM, Maringá, Brazil.* [In Portuguese.].
- Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.
- Neto, M. M., Neto, M. A., Braz Filho, R., Lima, M. A. S., Silveira, E. R. (2008). Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. *Biochemical systematics and ecology*, 36(3), 227-229.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nishimura, T., Sato, T., Yamamoto, Y., Watakabe, I., Ohkawa, Y., Suyama, M., Kobayashi, S. Tanaka, M. (2015). foxl3 is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in *medaka*. *Science*, 349(6245), 328-331.
- Ogiwara, K., Takano, N., Shinohara, M., Murakami, M., Takahashi, T. (2005). Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the *medaka*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8442-8447.
- Oliveira, R. M. M. D. (2012). Quantification of catechins and caffeine from green tea (*Camellia sinensis*) infusions, extract, and ready-to-drink beverages. *Food Science and Technology*, 32, 163-166.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular cell biology*, 8(3), 221-233.
- Pelzer, E. (1998). Acute and chronic Antiinflammatory effects of plant flavonoids. *il Farmaco*. v. 53.
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1-4), 229-281.
- Popma, T. J., Green, B. W. (1990). Reversão sexual de tilápias em tanques de terra. *Manual de produção em aquacultura*.
- Powell, W. C., Matrisian, L. M. (1996). Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Attempts to Understand Metastasis Formation I*, 1-21.

- Prado, A. (2009). Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. *Piracicaba-SP: Universidade de São Paulo*.
- Pudney, J. (1996). Comparative cytology of the Leydig cell. *The leydig cell*, 611-57.
- Quagio-Grassiotto, I., Grier, H. J., Mazzoni, T. S., Nóbrega, R. H., Amorim, J. P. (2011). Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). *Journal Morphology*, 272, 1290-1306.
- Quintero-Hunter, I., Grier, H. Muscato, M. (1991). Enhancement of histological detail using Metanil Yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotech. Histochemistry*, 66: 169-172.
- Rajkapoor, B., Jayakar, B., Murugesh, N., Sakthisekaran, D. (2006). Chemoprevention and cytotoxic effect of *Bauhinia variegata* against N-nitrosodiethylamine induced liver tumors and human cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology*, 104(3), 407-409.
- Reinboth, R. (1988). Physiological problems of teleost ambisexuality. *Environmental biology of fishes*, 22(4), 249-259.
- Reis, V. R., De Almeida, F. L., Piferrer, F. (2016). Produção de populações monossexo em peixes. *Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Ribeiro, R. I. M. A., Kuribayashi, J. S., Júnior, P. C. B., Beletti, M. E., Espíndola, F. S., Cassali, G. D., Loyola, A. M. (2010). Inibição de metaloproteinases por extratos aquosos de *Aloe vera*, *Annona muricata* e chá preto. *Bioscience Journal*, 26(1).
- Sadovy, Y., Shapiro, D. Y. (1987). Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*, 136-156.
- Saigg, N. L., Silva, M. C. (2009). Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. *Universitas: Ciências da Saúde*, 7(1), 69-89.
- Salatino, A., Blatt, C. T., Santos, D. Y. D., Vaz, A. M. (1999). Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. *Brazilian Journal of Botany*, 22, 17-20.
- Santana, J. C., Quagio-Grassiotto, I. (2014). Extracellular matrix remodeling of the testes through the male reproductive cycle in Teleostei fish. *Fish physiology and biochemistry*, 40(6), 1863-1875.
- Schiedeck, G., Bevilaqua, G. A. P., Nachtigal, G. D. F., Bauer, M. D. L. (2008). Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. *Embrapa Clima Temperado-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.
- Schmidt, M., Schmitz, H. J., Baumgart, A., Guedon, D., Netsch, M. I., Kreuter, M.

- H., Schrenk, D. (2005). Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food and Chemical Toxicology*, 43(2), 307-314.
- Schmitz, W., Saito, A. Y., Estevão, D., Saridakis, H. O. (2005). O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 26(2), 119-130.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390-411.
- Siegfried, K. R., Nüsslein-Volhard, C. (2008). Germline control of female sex determination in zebrafish. *Developmental Biology*, 324(2), 277-287.
- Silva, K. L. D., Cechinel Filho, V. (2002). Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, 25(3), 449-454.
- Silva, P. S., Navarro, F. (2007). Efeitos da ingestão de chá verde sobre a oxidação lipídica no sedentarismo e no exercício. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, 1(3), 45-60.
- Sonaglio, D., Ortega, G. G., Petrovick, P. R., Bassani, V. L. (2003). Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 5, 289-326.
- Strüssmann, C. A., Takashima, F., Toda, K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, 139(1-2), 31-45.
- Takabayashi, F., Tahara, S., Kaneko, T., Harada, N. (2004). Effect of green tea catechins on oxidative DNA damage of hamster pancreas and liver induced by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine and/or oxidized soybean oil. *Biofactors*, 21(1-4), 335-337.
- Takahashi, H. (1977). Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 28(2), 57-65.
- Takahashi, H., Shimizu, M. (1983). Juvenile intersexuality in a cyprinid fish, the Sumatra barb, *Barbus tetrazona tetrazona*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 34(2), 69-78.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical journal of Pharmaceutical research*, 7(3), 1089-1099.
- Teixeira, J. B. P., dos Santos, J. V., Ufjt, T. (2011). Fitoterápicos e interações medicamentosas.
- Thomé, R., Dos Santos, H. B., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N. (2010). Distribution of laminin β 2, collagen type IV, fibronectin and MMP-9 in ovaries of the teleost fish. *Journal of molecular histology*, 41(4), 215-224.

- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, 205(6), 711-718.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(1), 11-20.
- Valentin, F. N., Batlouni, S. R., Nascimento, N. F., Silva, R. C., Manzini, B., Hilbig, C. C., Santos, M.P., Nakaghi, L. S. O. (2016). Ovarian differentiation and development in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*. *Journal of fish biology*, 89(1), 445-466.
- Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.
- Vaz, A. M. S. F. (2010). Bauhinia in Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Available from <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB082666>.
- Vaz, A. M. S., Tozzi, A. M. G. (2005). Sinopse de Bauhinia sect. Pauletia (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. *Brazilian Journal of Botany*, 28, 477-491.
- Vazzoler, A. E. A. M. (1996). Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. *Maringá: Eduem*, 169.
- Velloso, C. C., Peglow, K. (2003). *Plantas medicinais*. EMATER, RS: ASCAR.
- Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827-839.
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Nguyen, M., Roach, P. D. (2010). Extraction and isolation of catechins from tea. *Journal of separation science*, 33(21), 3415-3428.
- Woessner Jr, J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal*, 5(8), 2145-2154.
- Wu, G. C., Tomy, S., Lee, M. F., Lee, Y. H., Yueh, W. S., Lin, C. J., Lau, E.L., Chang, C. F. (2010). Sex differentiation and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *General and Comparative Endocrinology*, 167(3), 417-421.
- Wu, S. C., Yen, G. C., Wang, B. S., Chiu, C. K., Yen, W. J., Chang, L. W., Duh, P. D. (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT-Food Science and Technology*, 40(3), 506-512.

- Yamamoto, T. O. (1969). 3 Sex Differentiation. In *Fish physiology* (Vol. 3, pp. 117-175). Academic Press.
- Zhang, J., Bai, S., Tanase, C., Nagase, H., Sarras, M. P. (2003a). The expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) is required for normal development of *zebrafish* embryos. *Development Genes and Evolution*, 213(8), 382-389.
- Zhang, J., Bai, S., Zhang, X., Nagase, H., Sarras Jr, M. P. (2003b). The expression of novel membrane-type matrix metalloproteinase isoforms is required for normal development of *zebrafish* embryos. *Matrix Biology*, 22(3), 279-293.
- Zhang, J., Bai, S., Zhang, X., Nagase, H., Sarras, M. P. (2003c). The expression of gelatinase A (MMP-2) is required for normal development of *zebrafish* embryos. *Development Genes and Evolution*, 213(9), 456-463.

ANEXO I

APROVAÇÃO DO PELA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUA - UNIFAL)

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG CEP 37130-000 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063	 Unifal-MG Universidade Federal de Alfenas
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL		
 CERTIFICADO 		
Certificamos que a proposta intitulada "Regulação das Metaloproteinases (MMPs) a partir de Compostos Naturais na Diferenciação Gonadal durante o Hermafroditismo Juvenil de <i>Danio rerio</i>", registrada com o nº 39/2017, sob a responsabilidade de Talita Sarah Mazzoni, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.		
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica	
Vigência da autorização	De 07/07/2017 a 31/05/2018	
Espécie/linhagem/raça	Peixe / <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	
Nº de animais	16	
Sexo	Machos: 12 Fêmeas: 4	
Origem	Loja de aquarismo	

Alfenas, 04 de Julho de 2017.


Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Coordenador CEUA-UNIFAL