

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/07/2020.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NA
FUNÇÃO TESTICULAR DE *Danio rerio* E
RELAÇÃO DOS HORMÔNIOS
TIREOIDIANOS COM O EIXO
HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-GONADAL**

Maira da Silva Rodrigues

Botucatu, São Paulo
2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NA
FUNÇÃO TESTICULAR DE *Danio rerio* E
RELAÇÃO DOS HORMÔNIOS
TIREOIDIANOS COM O EIXO
HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-GONADAL**

Maira da Silva Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega

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

Botucatu, São Paulo
2019

Rodrigues, Maira da Silva
R696e Efeitos do hipotireoidismo na função testicular de *Danio rerio* e
relação dos hormônios tireoidianos com o eixo hipotalâmico-
hipofisário-gonadal / Maira da Silva Rodrigues. -- Jaboticabal, 2019
vi, 100 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2019

Orientador: Rafael Henrique Nóbrega

Banca examinadora: Maeli Dal Pai, Luiz Renato de França

Bibliografia

1. Hipotireoidismo. 2. Hormônios tireoidianos. 3. Espermatogênese.
4. GnIH. 5. Zebrafish. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3:577.17

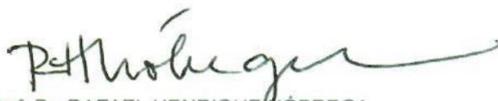
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "Efeitos do hipotireoidismo na função testicular de Danio rerio e relação dos hormônios tireoideanos com o eixo hipotalâmico - hipófiseo - gonadal"

AUTORA: MAIRA DA SILVA RODRIGUES

ORIENTADOR: RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA

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



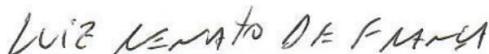
Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Professora Titular MAELI DAL PAI

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Professor Titular LUIZ RENATO DE FRANÇA

Departamento de Morfologia / Universidade Federal de Minas Gerais

Jaboticabal, 05 de julho de 2019.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. A espermatogênese em peixes teleósteos.....	1
1.2. Espermatogênese e características das células germinativas em zebrafish.....	04
1.3. Controle endócrino da gametogênese: Eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal (HHG).....	07
1.4. O papel da gonadotropina Fsh na espermatogênese dos peixes.....	10
1.5. O papel dos hormônios tireoidianos (Hts) no desenvolvimento e reprodução dos peixes.....	12
1.6. Alterações do estado da tireoide: uma abordagem dos efeitos do hipotireoidismo na reprodução de vertebrados.....	17
1.7. Hormônio Inibidor de Gonadotropinas (GnIH).....	18
1.8. Interação do GnIH nos eixos HPG-HPT na regulação da reprodução.....	20
1.9. O zebrafish como modelo biológico.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
4. REFERÊNCIAS.....	25
5. CAPÍTULO 1.....	33
6. CAPÍTULO 2.....	74
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	100

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Luiz Sergio e Marlene que,
com muito carinho e humildade,
me ensinaram amor, gratidão pela vida e respeito
ao próximo.
Vocês são os meus heróis!*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Rafael Henrique Nóbrega por sua preciosa orientação e seu grande desprendimento em ajudar-nos. Você nos inspira, professor! Você tem toda minha admiração e respeito.

Ao professor Dr. Hamid Habibi (University of Calgary, Canada), por abrir as portas do seu laboratório, por todo o suporte científico e financeiro dado durante o desenvolvimento do projeto. Tenho muita admiração pelo senhor.

À secretária Luciana e aos técnicos José Eduardo, Helton, Keila e Ricardo do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu/Unesp pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Ao David, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura (CAUNESP/Jaboticabal), por todo o suporte durante o período do mestrado.

Meus sinceros agradecimentos à banca avaliadora, prof. Dra. Maeli Dal Pai e prof. Dr. Luiz Renato França por aceitarem nosso convite e contribuírem com o trabalho.

Aos amigos do RMBG (Reproductive & Molecular Biology Group) UNESP-Botucatu: Anabel, Aldo, Arno, Beatriz, Daniel, Ivana, Juliana, Lucas, Emanuel, Marcos, Matheus e José pelo suporte no projeto, amizade e todos os momentos compartilhados.

Aos amigos da pensão e rep. Curva de Rio (Botucatu): Alan, Emerson, Henrique, Larissa, Nicolas, Ruan, Cristina, Ingrid, Juliana, Suyane e Pedro, agradeço pela amizade e companheirismo.

Ao cursinho voluntário Desafio – UNESP-Botucatu, na qual tive o prazer de lecionar geografia aos estudantes do ensino médio no ano de 2017. Foi um prazer imenso contribuir com esse trabalho.

Ao projeto médicos da alegria – UNESP – Botucatu. Uma das melhores experiências da minha vida.

À ARCA (Amigos Reunidos pela Causa Animal)-Botucatu, por fazerem um lindo trabalho na cidade e por resgatarem a Maria. Sem vocês, ela não estaria aqui.

Ao professor Dr. Diógenes Henrique de Siqueira Silva por me mostrar o caminho da ciência. Sou muito grata à sua amizade e parceria desde a graduação.

Aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas (UNESP/Ilha Solteira): Bianca, Bruno, Cíntia, Maria Luiza, Luiz e Juliana. Muito obrigada pela amizade.

A minha mãe postiça de Ilha Solteira. Obrigada pelo carinho e amor, tia Sandra.

As meninas do MEGRL (Molecular Endocrinology of Growth and Reproduction Lab) University of Calgary – Canada: Adriana, Claudia, Hamideh, Jenny e Maya, pelo conhecimento compartilhado e amizade. Sou muito grata por ter conhecido vocês.

A Bonnie e sua família, pelo acolhimento durante o período que morei no Canadá. Me senti parte da família! Jamais esquecerei seus gestos de carinho comigo.

Aos meus amigos da vila São Luiz de Japiúba: Camila e Ronivaldo. Tenho um carinho imenso por vocês.

A minha família por todo o amor, por estarem tão presentes na minha vida, tenho orgulho por tê-los na minha jornada aqui na Terra! Obrigada por me incentivarem a lutar pelos meus sonhos. Vocês me enchem de coragem para seguir em frente! Muito obrigada. Amo vocês!

Ao meu namorado Rodrigo que sempre esteve ao meu lado me incentivando, e por todo seu amor e paciência, amo-te!

A todos que conheci, meu muito obrigada. Direta ou indiretamente vocês contribuíram para minha formação pessoal, que de alguma forma me inspirou na vida acadêmica.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPESP, através do convênio FAPESP/CAPES, PROCESSO nº 2017/15793-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho também teve o apoio da FAPESP, através do convênio FAPESP/CAPES, PROCESSO nº 2018/15319-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

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

A vaidade e a fortuna são os que governam essa farsa da vida; cada um se põe no teatro com a pompa com que a fortuna e a vaidade o põem; ninguém escolhe o papel; cada um recebe o que lhe dão. Aquele que sai sem fausto, nem cortejo, e que logo no rosto indica que é sujeito à dor, à aflição e à miséria, esse é o que representa o papel de homem. A morte está de sentinela, em uma mão tem o relógio do tempo, na outra tem a foice, e com esta, de um golpe certo e inevitável, dá fim à tragédia, corre a cortina e desaparece (...) assim acaba o homem, assim acabam as suas glórias, e só assim acaba sua vaidade.

Matias Aires Ramos da Silva de Eça- filósofo e escritor português nascido em São Paulo- Brasil

RESUMO

Dentre os aspectos hormonais que influenciam o desenvolvimento dos vertebrados, pode-se destacar o papel dos hormônios tireoidianos (Hts). Esses hormônios (T4/T3) mediam funções imprescindíveis para a homeostase dos organismos, modulando processos fisiológicos como a regulação do crescimento, metabolismo e reprodução. Pensando nisso o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do hipotireoidismo *in vivo* e *in vitro* na função testicular de machos adultos de *D. rerio* e a relação dos Hts no eixo hipotalâmico-hipofisário. No presente trabalho nós mostramos que *in vivo* o hipotireoidismo induzido pelo methimazole afetou a espermatogênese de zebrafish levando ao acúmulo de células pré-meióticas, atraso na diferenciação e meiose, reduzindo a quantidade de espermatozoides formados. *in vitro* foi observado que os efeitos biológicos do hormônio folículo estimulante (Fsh) na função testicular são dependentes dos hormônios tireoidianos, assim como os efeitos estimulatórios da gonadotropina coriônica humana (hCG) e inibitório do hormônio inibidor de gonadotropina (GnIH) necessitam dos Hts. Além disso, a expressão de genes hipotalâmicos e hipofisários foram afetados de modo antagônico quando na ausência ou presença dos Hts. Portanto nossos resultados indicam que os hormônios tireoidianos são essenciais na manutenção da espermatogênese e do eixo hipotalâmico-hipofisário em adultos de zebrafish.

Palavras-chave: hipotireoidismo, hormônios tireoidianos, espermatogênese, GnIH, zebrafish

ABSTRACT

Among the hormonal aspects that influence the development of vertebrates, the role of thyroid hormones (Ths) are crucial. These hormones (T4/T3) have a key role on the organism's homeostasis by modulating physiological processes, including regulation of growth, metabolism and reproduction. This study assessed the effects of *in vivo* and *in vitro* hypothyroidism on the testicular function of *D. rerio* adult males and the interaction between thyroid hormones in the brain-pituitary axis. Here we show that methimazole-induced hypothyroidism *in vivo* affected the progression of zebrafish spermatogenesis by inducing the accumulation of pre-meiotic cells, delaying cell-differentiation and meiosis as well reducing the number of spermatozoa. It was established *in vitro* that the effects of the follicle-stimulating hormone (Fsh) on testis function are dependent of thyroid hormones, likewise the stimulatory effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and the inhibitory effects of gonadotropin- inhibitory hormone (GnIH) are also subject to Ths. In addition to that, gene expression of brain-pituitary was antagonistically affected both in the absence and in the presence of Ths. These results point to how essential the thyroid hormones are in regulating spermatogenesis and maintaining the brain-pituitary axis in adult zebrafish.

Key-words: hypothyroidism, thyroid hormones, spermatogenesis, GnIH, zebrafish

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Espermatogênese em peixes teleósteos

Dentre aproximadamente 60.000 espécies de vertebrados conhecidas, descritas e vivas do mundo, os peixes ocupam o grupo com maior diversidade e abundância, constituindo cerca de 32.000 espécies, o que representa mais de 50% dos vertebrados (Nelson et al., 2006 e 2016). O sucesso desse grupo é atribuído a uma série de adaptações desenvolvidas ao longo da evolução que refletem na diversidade morfológica, comportamental, fisiológica e principalmente nas estratégias reprodutivas, que são definidas como o conjunto de características que uma espécie desenvolve para ter sucesso na reprodução e assim garantir a sobrevivência da espécie (Reis et al., 2003; Nelson et al., 2006 e 2016).

Estas estratégias reprodutivas estão diretamente relacionadas com a morfologia das gônadas das diferentes espécies. Nos teleósteos com fertilização externa, os testículos geralmente são pares e alongados (Billard et al., 1982; Vazzoler, 1996; Grier e Aranzábal, 2009), localizados na cavidade celomática e envolvidos pelo tecido conjuntivo, denominado de túnica albugínea. Esse tecido emite projeções para o interior do órgão formando lóbulos ou túbulos seminíferos que sustentam o tecido epitelial germinativo (Grier, 1980).

Microscopicamente os testículos apresentam dois compartimentos distintos: (1) intersticial formado por um tecido conjuntivo, contendo células de Leydig (produtoras de esteroides), vasos sanguíneos, macrófagos, granulócitos e outros; (2) compartimento germinativo, que contém as células germinativas e as células de Sertoli que em conjunto formam o epitélio germinativo (Schulz e Nóbrega, 2011; Siqueira-Silva et al., 2018) (Fig. 1). A espermatogênese depende

da interação dos componentes celulares presentes nestes dois compartimentos (Grier et al., 1980).

O processo espermatogênico é considerado altamente coordenado, no qual as células diploides iniciais conhecidas como espermatogônias tronco, que além de se auto-renovarem após os eventos reprodutivos, passam pelos processos de proliferação mitótica e diferenciação para formar os espermatozoides (Schulz et al., 2010). Ao final de diversas divisões mitóticas espécie-específica, os espermatócitos iniciam o processo meiótico e por fim passam pela diferenciação celular ou espermiogênese, que resultará na formação das células haploides, os espermatozoides (Grier et al., 1980; Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010; Siqueira-Silva et al., 2012).

Diferente dos amniotas, considerados os vertebrados derivados (Fig. 1A), em peixes e outros vertebrados anamniotas, a espermatogênese desenvolve-se no interior de estruturas denominadas de espermatocistos, ou cistos, que são formados quando as células de Sertoli envolvem as células germinativas em desenvolvimento (Fig.1B) (Vilela et al., 2003; Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010). As células de Sertoli fornecem suporte mecânico, nutricional e fatores necessários para a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células germinativas, assim como intermediação hormonal e fagocitose de restos celulares e espermatozoides residuais (Grier et al., 1980; Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010; Siqueira-Silva et al., 2012; França et al., 2016).

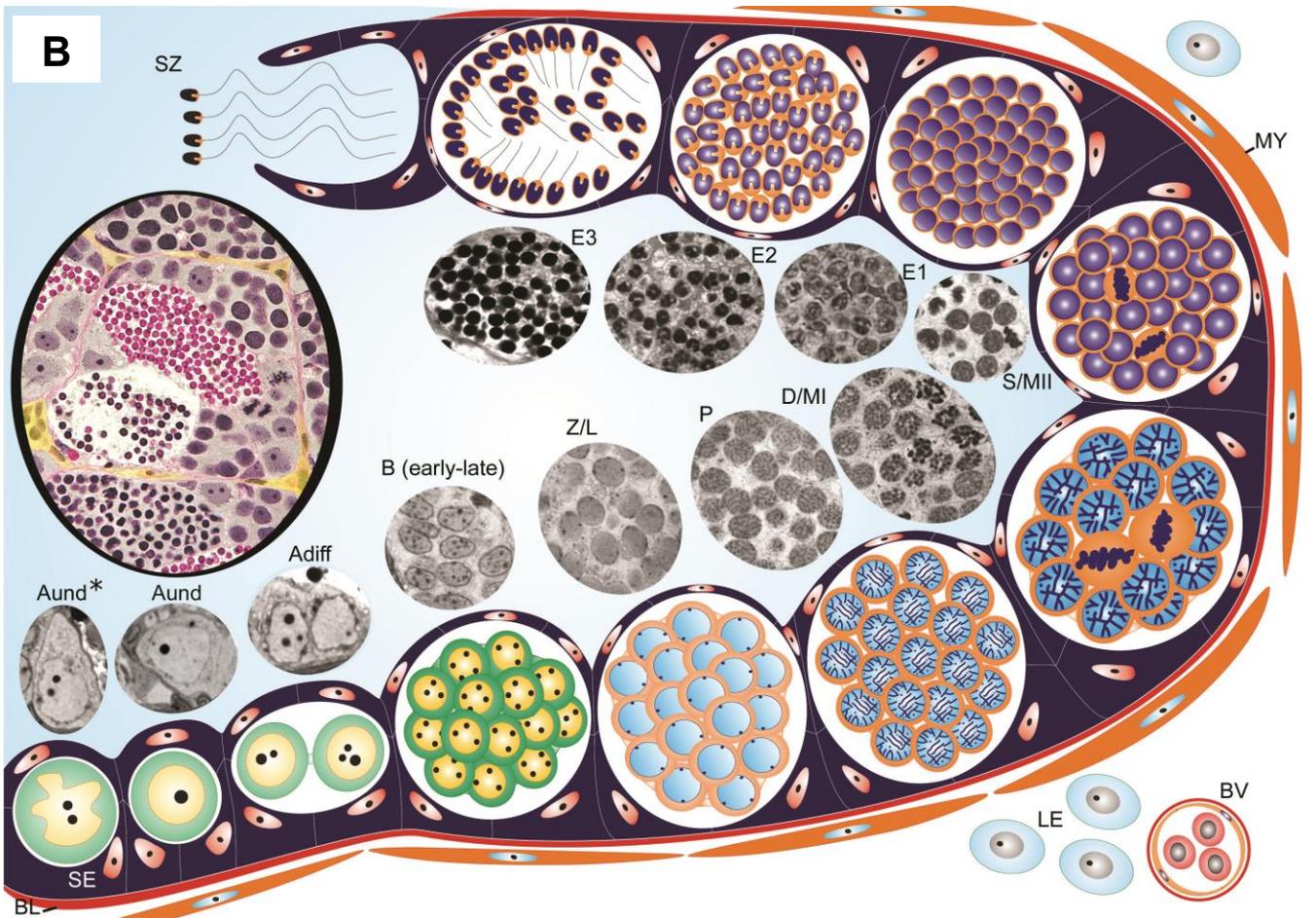
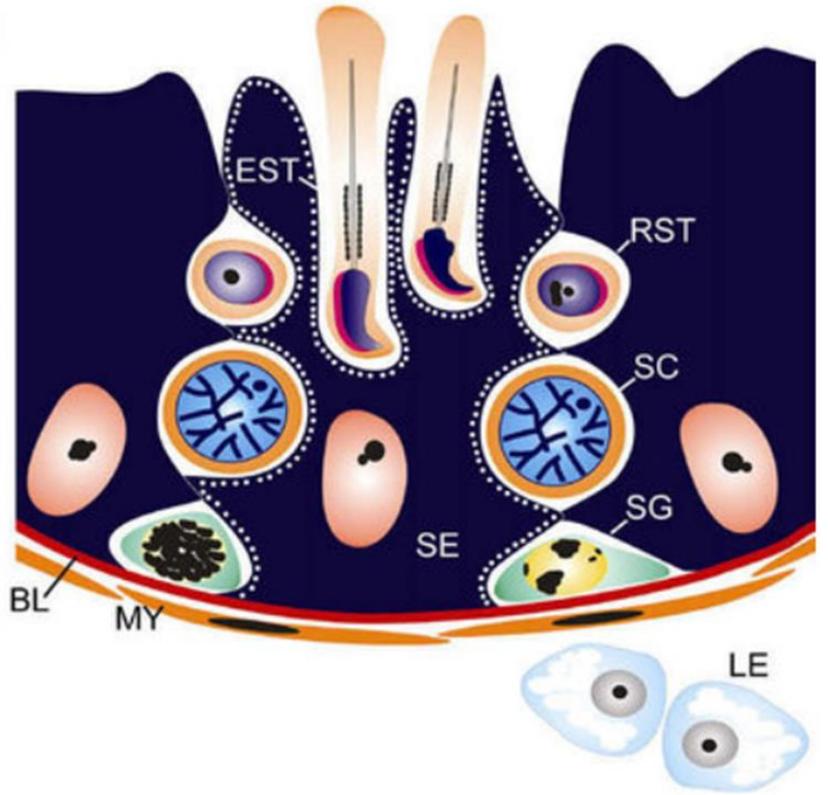
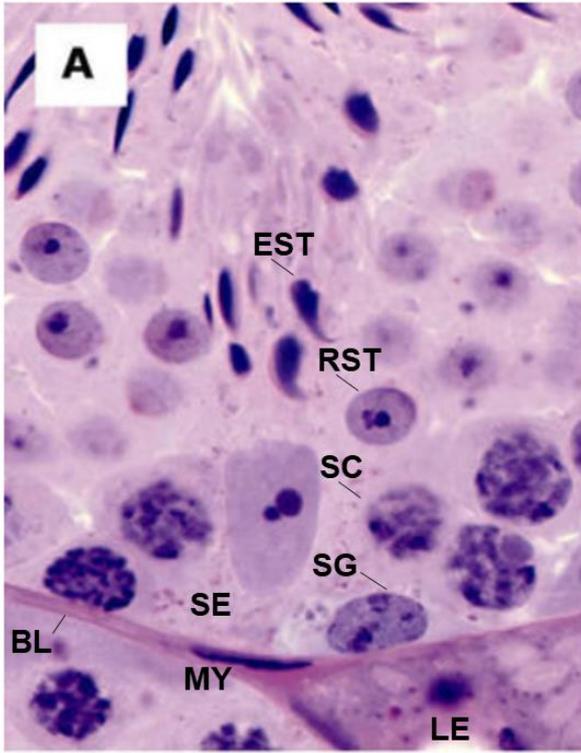


Figura 1 A) Espermatogênese em mamíferos. **B)** Espermatogênese em zebrafish. Legenda: células de Sertoli (SE); lâmina basal (BL); células peritubulares mióides (MY), células de Leydig (LE), espermatogônia (SG); espermatócito (SC); espermátide arredondada (RST); espermátide alongada (EST); espermatogônia do tipo A indiferenciada* (A_{und}^*) (célula tronco?); espermatogônia do tipo A indiferenciada (A_{und}); espermatogônia do tipo A diferenciada (A_{diff}); espermatogônia do tipo B (B early-late); espermatócitos primários em leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno/metáfase I (D/MI); espermatócitos secundários/metáfase II (S/MII); espermátides iniciais (E1); intermediárias (E2); finais (E3); espermatozoides (SZ); e vasos sanguíneo (BV). Adaptado de Schulz e colaboradores (2010).

1.2. Espermatogênese e características das células germinativas em zebrafish

As características morfofuncionais dos diferentes estágios de desenvolvimento das células germinativas durante a espermatogênese em zebrafish foram descritas (Leal et al., 2009; Schulz et al., 2010). Estas células são identificadas de acordo com o formato do núcleo, condensação da cromatina e tamanho da célula, sendo divididos em três fases: (1) fase mitótica ou espermatogonial, caracterizada por sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias indiferenciadas (A_{und}^* e A_{und}), espermatogônia diferenciada (A_{diff}) e do tipo B; (2) a fase espermatocitária ou meiótica na qual o material genético dos espermatócitos é duplicado, recombinado e segregado formando as células haploides, as espermátides; (3) e a fase denominada espermiogênese, na qual as espermátides passam por modificações estruturais e funcionais altamente complexas para originar os espermatozoides aptos a fecundação (Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010) (Fig. 2).

Fase mitótica ou espermatogonial

As espermatogônias indiferenciadas do tipo A (A_{und}^* e A_{und}) são encontradas isoladas no epitélio germinativo e estão envoltas por um conjunto de células de Sertoli (Schulz et al., 2010). Além disso são as maiores células da

linhagem germinativa, com diâmetro nuclear e volume celular medindo cerca de $8.6 \mu\text{m}$ e $\sim 667 \mu\text{m}^3$, respectivamente (Leal et al., 2009). A cromatina não está completamente condensada e pode ser encontrado um ou dois nucléolos compactos (Leal et al., 2009). As espermatogônias A_{und^*} são distinguidas das demais espermatogônias pela irregularidade do seu envoltório nuclear e pela razão entre núcleo e citoplasma serem maior. Além disso, por meio da técnica de BrdU (5'-bromo-2'-deoxiuridina), um nucleotídeo sintético e análogo à timidina, o que confere a capacidade de poder ser incorporado e retido no DNA durante a fase de síntese (fase S), foi possível identificar a existência de possíveis espermatogônias tronco, as chamadas "labeling-retaining cells" que retiveram BrdU a longo prazo, estas supostas células estão entre as espermatogônias indiferenciadas (A_{und^*} e A_{und}) (Nóbrega et al., 2010).

As espermatogônias diferenciadas (A_{diff}) são resultantes da mitose com citocinese incompleta. Estas células estão agrupadas em pequenos cistos contendo de duas a oito células. Além de serem menores, apresentando diâmetro nuclear médio de $6 \mu\text{m}$, comparada aos tipos anteriores, possuem um formato regular e arredondado, com um, dois ou mais pequenos nucléolos. A heterocromatina possui pontos densos ao longo do núcleo (Leal et al., 2009).

As espermatogônias iniciais do tipo B (B early) são mais condensadas e possuem um núcleo alongado com um ou dois nucléolos pequenos. A quantidade de heterocromatina aumenta. As células do tipo tardia (B late) possuem um número maior de células dentro do cisto. O núcleo é arredondado, denso e heterocromático (Leal et al., 2009) (Fig.2).

Fase espermatocitária ou meiótica

Os espermatócitos apresentam um diâmetro nuclear médio de 5 μm e estão em diferentes fases da meiose. Podem ser identificados e diferenciados pelo tamanho do núcleo, condensação da cromatina e pelas figuras meióticas. Em leptóteno/zigóteno as células são mais arredondadas em relação as espermatogônias do tipo B e a cromatina apresenta pequenos pontos próximos ao envoltório nuclear. Espermatócitos em paquíteno são maiores, o núcleo é denso e os cromossomos estão mais condensados. Já os espermatócitos em diplóteno são encontrados em conjunto com as figuras da metáfase I. Nesse tipo celular os cromossomos atingem o grau máximo de condensação. Por fim, os espermatócitos secundários são considerados raros pois entram rapidamente na meiose II. Este tipo celular possui um núcleo arredondado e cromatina densa (Leal et al., 2009) (Fig. 2).

Espermiogênese

Durante a espermiogênese, o volume nuclear das células é reduzido e a classificação de três tipos de espermátides: iniciais, intermediárias e finais (E1, E2 e E3) são baseadas no aumento da compactação nuclear, diminuição do volume celular e espaçamento entre as células devido a formação dos flagelos (Leal et al., 2009) (Fig. 2).

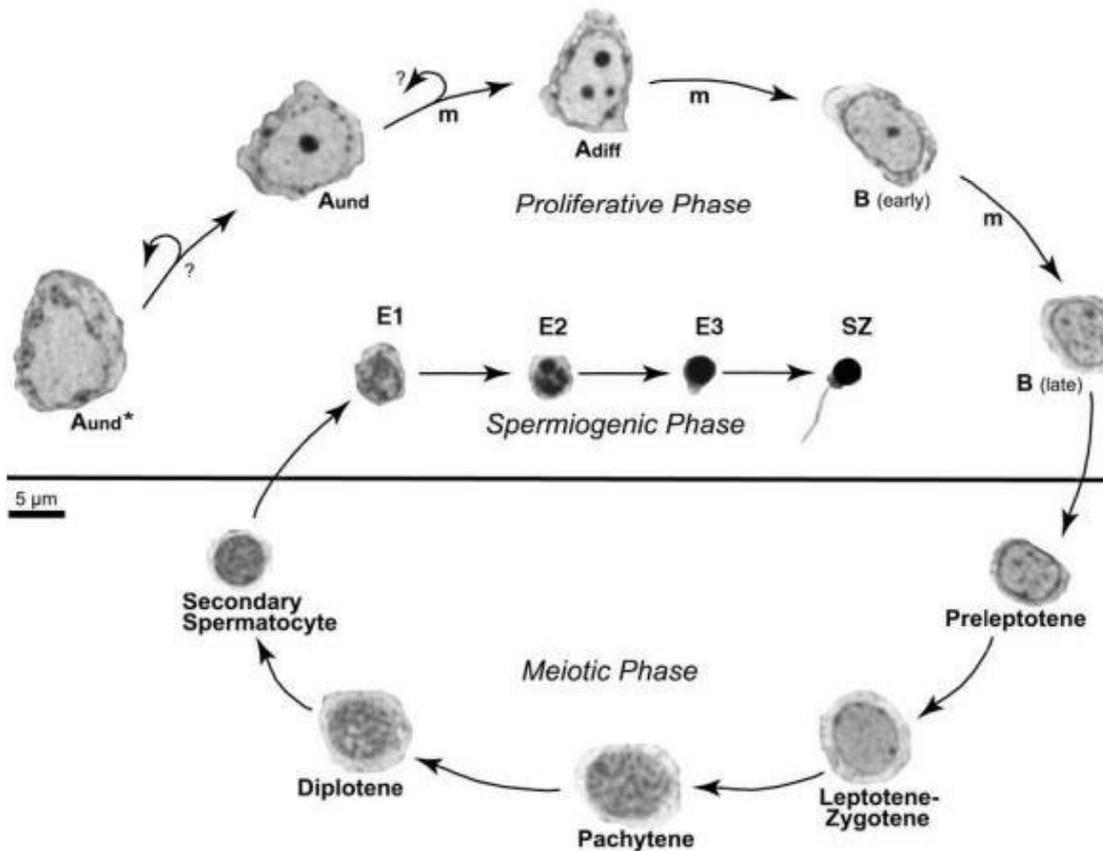


Figura 2: Representação da espermatogênese em zebrafish. **Fase espermatogonial:** espermatogônia indiferenciada do tipo A (A_{und}^* e A_{und}), espermatogônia diferenciada (A_{diff}), espermatogônia do tipo B inicial e final (B early-late). **Fase meiótica:** pre-leptóteno, leptóteno/zigóteno, paquíteno, diplóteno e espermatócito secundário. **Fase espermiogênica:** espermatídes iniciais, intermediárias e finais (E1,E2,E3) e espermatozoide (SZ). Retirado de Schulz e colaboradores (2010).

1.3. Controle endócrino da gametogênese: Eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal (HHG)

A reprodução é um dos mecanismos mais importantes para a perpetuação das espécies e evolução (Osugi et al., 2014). Para que ocorra o sucesso reprodutivo é necessário a combinação do sistema nervoso com o endócrino, integrado à fatores externos como o fotoperíodo, alimentação e predação e a fatores internos, como ação hormonal. Nos peixes e demais vertebrados, a reprodução é regulada por uma cascata hormonal ao longo do eixo hipotalâmico-

hipofisário-gonadal (HHG) (Fig. 3). Esse sistema é iniciado com a produção do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) proveniente do hipotálamo (Meethal et al., 2005; Habibi e Andreu-Vieyra, 2007) e estimulado pela kisspeptina (Kiss).

O GnRH foi inicialmente descoberto e isolado em porcos (Baba et al., 1971). Estruturalmente é composto por dez aminoácidos, sendo um decapeptídeo e com diferentes isoformas. Este neuropeptídeo tem papel fundamental na ativação do eixo HHG pela estimulação das células hipofisárias produtoras e secretoras das gonadotropinas (Fsh e Lh) (Pankhurst, 2016), que, por sua vez, atuam nas gônadas regulando a gametogênese e esteroidogênese. Interessante que o modo de ação do GnRH para alcançar as células gonadotrópicas é diferente entre teleósteos e os demais vertebrados. Neste último, o GnRH é liberado na eminência média e um sistema vascular porta-hipofisário para o transporte de neuro-hormônios, que o leva até as células gonadotrópicas por meio da corrente sanguínea (Fink, 1988). Em teleósteos, o GnRH é liberado nas proximidades das células gonadotrópicas. Os terminais das fibras dos neurônios na hipófise conectam-se com as células da hipófise e juntos estas fibras formam a neuro-hipófise (Yamamoto et al., 1995).

Peixes teleósteos têm três diferentes formas de GnRH localizadas em diferentes regiões do encéfalo, enquanto a maioria dos vertebrados expressa apenas duas formas de GnRH (Kawai et al., 2009). O GnRH3 foi identificado nos gânglios nervosos terminais apenas nos peixes e acredita-se ser um neuromodulador. O GnRH2 é idêntico nas espécies até hoje examinadas e têm papel na modulação das vias reprodutivas. Já o GnRH1 é a forma hipofisiotrópica

produzidas na área pré-óptica no hipotálamo que estimula a glândula hipofisária (Kuo et al., 2005; Kawai et al., 2009).

Adicionalmente, foi identificado primeiramente em aves e depois em peixes outro neuropeptídeo com ação regulatória na síntese e liberação de gonadotropinas, o hormônio inibidor de gonadotropinas (GnIH) (Tsutsui et al., 2010; Zohar et al., 2010). O GnIH atua diretamente na hipófise, no entanto como observado por Zohar e colaboradores (2010), pode exercer ação modulatória nos neurônios de GnRH devido as fibras de GnIH serem emitidas na direção do GnRH. Juntos estes neuropeptídeos estão envolvidos no controle da reprodução.

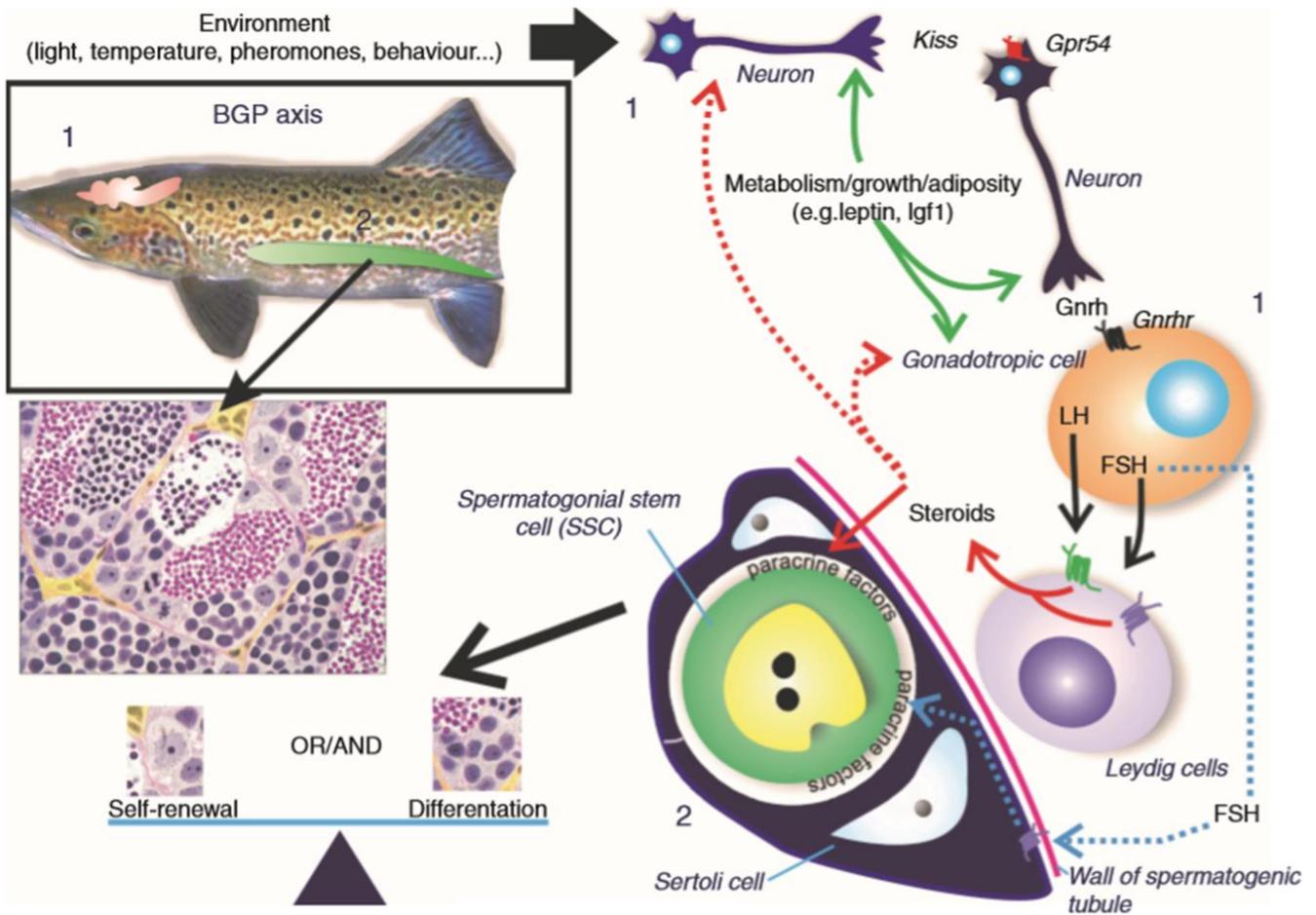


Figura 3: Representação do eixo reprodutivo nos peixes. O início do processo se dá a partir dos estímulos ambientais, como temperatura da água e fotoperíodo seguido pela cascata de hormônios ao longo do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que tem início com os neurônios de kisspeptina (Kiss) no hipotálamo. Por meio de seus receptores (Gpr54), a Kiss estimula a produção do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), que atua sobre as células hipofisárias estimulando a produção e liberação das gonadotropinas (Fsh e Lh). Ambos são levados pela corrente sanguínea atuando em suas células alvo no testículo. Fsh e Lh estimulam a produção e liberação de esteroides, estes tem efeito feedback negativo (linha tracejada) no hipotálamo e hipófise. O Fsh regula o desenvolvimento das espermatogônias tronco (auto-renovação e/ou diferenciação) através da produção de fatores parácrinos produzidos pelas células de Sertoli. (1) representa o sistema nervoso composto pelo hipotálamo e hipófise. (2) indica o testículo. A figura também representa a influência dos fatores internos, como: metabolismo, crescimento, adiposidade, dentre outros) sob os neurônios produtores de Kiss e GnRH. Retirado de Schulz e Nóbrega (2011).

1.4. O papel da gonadotropina Fsh na espermatogênese dos peixes

As gonadotropinas, hormônio folículo estimulante (Fsh) e hormônio luteinizante (Lh) são glicoproteínas formadas por duas subunidades diferentes, a subunidade α , comum aos dois hormônios e a subunidade β , específica de

acordo com a atividade biológica de cada hormônio (Schulz et al., 2001). Estes dois hormônios gonadotrópicos possuem papel crucial na regulação da espermatogênese (Pierce e Parsons, 1981).

Em mamíferos, ambas as gonadotropinas são claramente definidas, dadas as interações altamente específicas entre cada hormônio e seu respectivo receptor (McLachlan et al., 1996). O Lh atua nas células de Leydig estimulando a produção e liberação de andrógeno. Enquanto o Fsh regula a função das células de Sertoli, como suporte estrutural, nutricional e regulatório no desenvolvimento das células germinativas (Huhtaniemi e Themmen, 2005). Porém em peixes, as interações entre as gonadotropinas e seus receptores parecem não serem específicas (Sambroni et al., 2007). Estudos em salmão fornecem evidências de que o receptor de Fsh apesar de ter preferência pelo Fsh também apresenta afinidade pelo Lh (Miwa et al., 1994). Também, em peixes, o Fsh é considerado mais potente que o Lh na estimulação da produção de andrógeno, devido a presença do receptor de Fsh nas células de Leydig (Planas et al., 1993), como descrito em *Clarias gariepinus* (García-Lopez et al., 2009) e *D. rerio* (García-Lopez et al., 2010).

Ainda, segundo Nóbrega e colaboradores (2015) a atuação do Fsh nas células de Sertoli em peixes tem sido associado ao aumento da proliferação e diferenciação de espermatogônias através da produção do fator de crescimento semelhante à insulina 3 (Igf3) e também do peptídeo 3 semelhante a insulina (InsI3) (García-Lopez et al., 2010). Porém, foi demonstrado por Skaar e colaboradores (2011) que o hormônio antimülleriano (Amh), na qual é expresso nas células de Sertoli associadas às espermatogônias indiferenciadas, inibe a ação estimulatória do Fsh sobre os fatores de crescimento. A ação do Amh é

conhecida por bloquear a diferenciação das espermatogônias indiferenciadas e a síntese de esteroides dependentes de Fsh (Skaar et al., 2011; Adolf et al., 2018). Desta forma, pode-se dizer que o Fsh é um importante regulador do processo espermatogênico, atuando na estimulação e inibição de fatores necessários para o desenvolvimento deste processo.

Outro indício que o Fsh está relacionado com a espermatogênese e é um fator chave para esse processo é descrito por Crespo e colaboradores (2016), na qual mostraram que o Fsh estimulou a proliferação espermatogonial acompanhada pela modulação de vários sistemas de sinalização. Além disso essa gonadotropina impactou significativamente nos genes metabólicos, como no metabolismo de lactato e ácidos graxos e nos componentes da barreira das células de Sertoli. Também, estudos realizados com salmonídeos mostraram que o aumento dos níveis de Fsh no plasma estão associados com os elevados níveis de andrógenos e com a maior atividade de proliferação e diferenciação das espermatogônias (Campbell et al., 2003; Melo et al., 2014).

Além disso, há evidências de que o Fsh quando associado aos hormônios tireoidianos (Hts) tem sua ação potencializada, principalmente na liberação de esteroides, como o *cyp17a1* nos testículos adultos de zebrafish (Morais et al., 2013).

1.5. O papel dos hormônios tireoidianos (Hts) no desenvolvimento e reprodução dos peixes

O eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoide (HHT) é dependente da liberação de TRH (hormônio liberador de tireotrofinas) pelo hipotálamo. O TRH, por sua vez, estimula a secreção do hormônio estimulante da tireoide (TSH) (Larsen et

al., 1998; Flik et al., 2006). Em peixes, a liberação do Tsh é mediado pelo Crh ou Crf (hormônio liberador de corticotrofina) (Flik et al., 2006). O Crf é também o responsável pela liberação do Acth (hormônio corticotrófico) que estimula a síntese e secreção do cortisol pela glândula interrenal, em peixes (Larsen et al., 1998; Flik et al., 2006) (Fig. 4).

O Tsh atua nos folículos tireoidianos estimulando a produção da tetraiodotironina (T4) que é a principal configuração de Ht (Flik et al., 2006). A T4 é metabolizada e convertida em triiodotironina (T3), que corresponde a forma bioativa na maioria dos processos fisiológicos, como crescimento e maturação (Basset et al., 2003; Wagner et al., 2008; Flood et al., 2013).

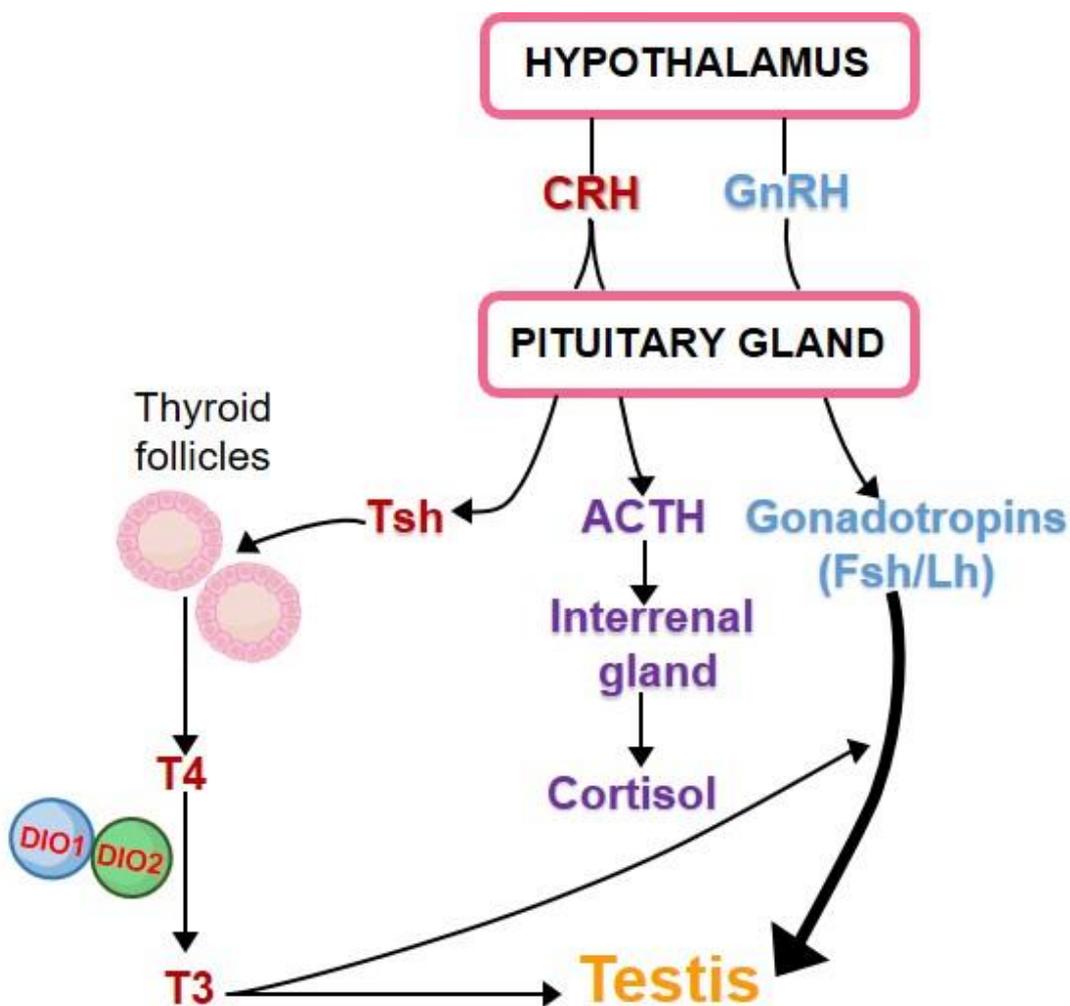


Figura 4: Eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoide (HHT). A hipófise secreta Tsh (hormônio estimulador da tireoide). O Crh também estimula o hormônio corticotrófico (Acth), que promove a síntese e secreção do cortisol pela glândula interrenal. Nos folículos tireoidianos, os quais são dispersos em peixes, o Tsh estimula a secreção do T4. Pela ação das (DIO1 e DIO2) convertem o T4 em T3, na qual atuará no eixo reprodutivo. Retirado de Tovo-Neto e colaboradores (2018).

A produção e metabolismo dos Hts ocorrem por meio de três tipos de enzimas denominadas de iodotironinas desiodases, do tipo I, II e III (Fig. 5) (Duarte-Guterman et al., 2014).

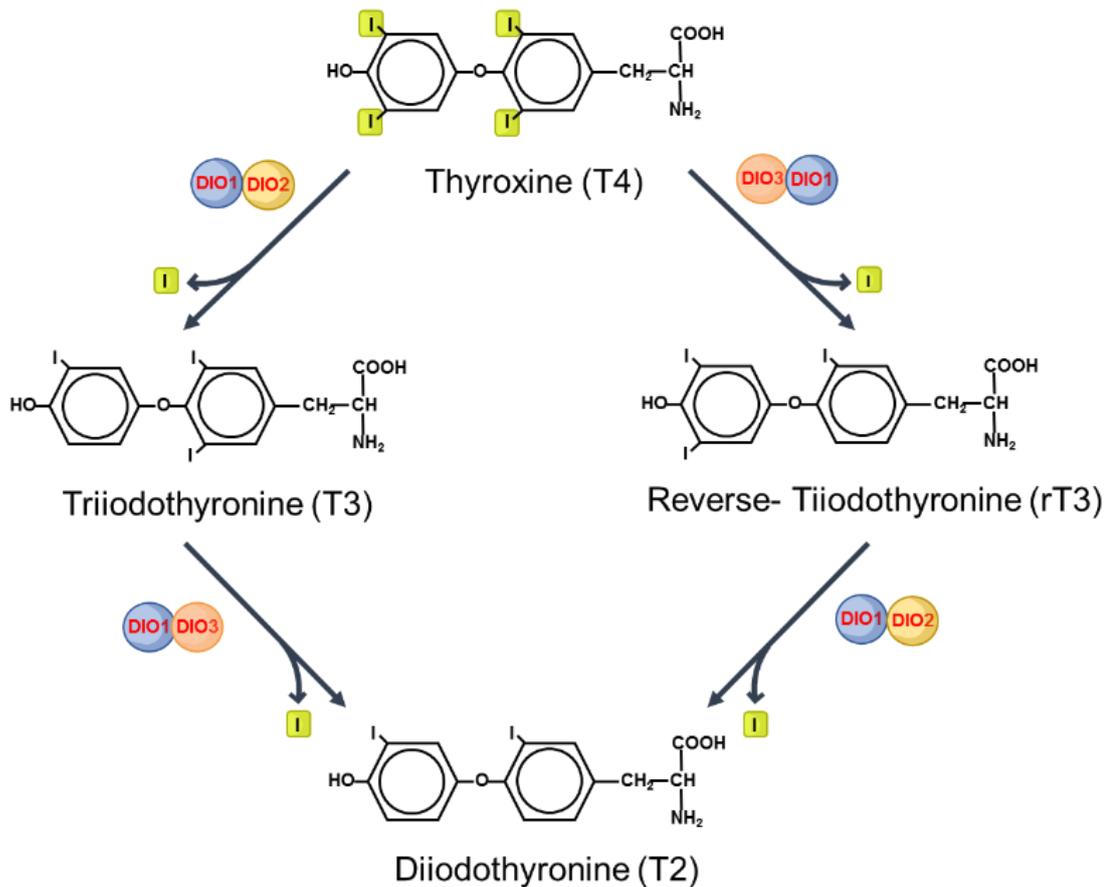


Figura 5: Metabolismo do hormônio tireoideano (T3) pelas desiodinases. A tiroxina (T4), principal produto secretado pelos folículos tireoidianos, é transformada no hormônio bioativo (T3) pela ação das iodotironinas desiodases tipo I e II (DIO1 e DIO2). A DIO1 também atua na produção do T3r, que é a sua forma inativa por meio da T4. Retirado de Tovo-Neto e colaboradores (2018).

A desiodase tipo I (DIO1) catalisa a desiodação do anel externo da T4 para produzir a forma bioativa, T3. Além disso, a DIO1 também desiodisa o anel interno da T4 para produzir T3 reverso (T3r), que é a sua forma inativa. O tipo II (DIO2) atua exclusivamente na ativação dos Hts pela conversão de T4 em T3

(Duarte-Guterman e Trudeau, 2010). A expressão e atividade das enzimas desiodases nos tecidos individuais regulam a concentração dos Hts ativos dependendo das necessidades específicas do tecido (Flood et al., 2013).

Os receptores dos Hts ($TR\alpha$ e $TR\beta$) atuam principalmente como fatores de transcrição nuclear, os quais ao se ligarem aos Hts formando um complexo hormônio-receptor, e a partir desse momento são capazes de desencadear respostas celulares pela ligação à região regulatória dos promotores dos genes, estimulando ou inibindo a transcrição (Mendis-Handagama et al., 2005).

Embora os Hts sejam notadamente conhecidos por regular o metabolismo, sua ação na reprodução vem sendo investigada. Nos roedores machos, o T3 tem a função de regular a maturação e o crescimento dos testículos, controlar a proliferação e diferenciação das células de Sertoli e Leydig durante o desenvolvimento testicular (Cooke et al., 2005).

Em peixes, a estrutura da tireoide é difusa e não encapsulada, embora apresentem uma estrutura folicular semelhante à dos mamíferos (Higgs et al., 1982). A função da tireoide é dependente da captação da iodina, e está envolvida na síntese e transporte dos Hts (Brucker-Davis, 1998). Esses hormônios regulam o crescimento e desenvolvimento (Chang et al., 2012) e suas funções são mediadas por meio de ligações a receptores específicos (Habibi et al., 2012).

Em fêmeas de salmonídeos, os níveis de Hts são mais elevados nos ovos, supostamente de origem materna, devido ao seu acúmulo nos oócitos durante a maturação ovariana (Tagawa et al., 1994). Em outras espécies de peixes teleósteos, tais como o linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*), o zebrafish (*D. rerio*) e a dourada (*Sparus aurata*), os níveis de Hts também permanecem elevados durante o desenvolvimento larval (Power et al., 2001). Na fase adulta,

os níveis de Hts permanecem estáveis (Chang et al., 2012) e estes parecem desempenhar um papel regulatório no eixo reprodutivo.

Neste contexto, Cooke e colaboradores (2005) demonstraram que a alteração da tireoide pode impactar no desenvolvimento da espermatogênese em ratos. A exposição ao 6-propil-2-tiouracil (PTU, um inibidor da produção de Ht) durante o período neonatal de ratos resultou no aumento dos testículos e maior produção de espermatozoides na fase adulta (Cooke 1991). Esse aumento dos testículos no tratamento com PTU é resultante do aumento da área do túbulo seminífero e dos componentes intersticiais (Hess et al., 1993), acompanhado pelo aumento da proliferação das células de Sertoli (Hess et al., 1993). Estudos explicam que esse efeito ocasionado pela ausência dos Hts é resultante do retardamento da transição da fase proliferativa para a fase de maturação das células de Sertoli, resultando no prolongamento da mitose deste tipo celular e consequentemente no amadurecimento destas células (Hess et al., 1993; Cooke et al., 2005). A imaturidade das células de Sertoli torna mais lenta a abertura dos túbulos seminíferos e prejudica a sua capacidade de suportar os estágios mais avançados das células germinativas (França et al., 1995).

Os efeitos do PTU na espermatogênese de peixes também foram avaliados. Matta e colaboradores (2002) avaliaram os efeitos do hipotireoidismo neonatal transitório em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Nestes animais, o tamanho dos testículos foi duplicado, semelhante ao que foi encontrado em ratos (Joyce et al., 1993). Estes resultados sugerem que o hipotireoidismo neonatal transitório em juvenis de tilápias levou a um aumento na proliferação das células de Sertoli e consequentemente maior proliferação das células germinativas que refletiu no tamanho do testículo.

Outros estudos abordando o papel dos Hts na função reprodutiva foram reportados em goldfish adultos (Habibi et al., 2012). Neste estudo, os animais que receberam doses de T3 (25 e 250 ng/peixe) diminuíram significativamente a expressão dos níveis de RNAm de *lhβ* e *fshβ* (Nelson et al., 2010). Sendo assim, os resultados sugerem que os Hts podem reduzir as funções reprodutivas, considerando que os Hts regulam o metabolismo e estimulam o crescimento na maioria das espécies (Hulbert, 2010), é provável que o aumento dos níveis de Ht possa desviar a energia da reprodução e promover funções somatotrópicas, o que explicaria a redução de Lh e Fsh (Habibi et al., 2012).

Outro resultado interessante é descrito na revisão de Flood e colaboradores (2013) sobre este assunto. Nesta revisão foi demonstrado que Fsh é um importante mediador do hormônio estimulador da tireoide (Tsh) no desenvolvimento sexual em machos e os genes da biossíntese de andrógenos são induzidos pelos Hts (Flood et al., 2013). Desta forma, os Hts induzem respostas na produção e secreção das gonadotropinas e também influenciam a biossíntese dos hormônios esteroides masculinos.

Neste contexto, Morais e colaboradores (2013) mostraram em zebrafish que o hormônio T3 potencializa os efeitos do Fsh nos machos, aumentando a liberação de andrógeno (11KT, principal andrógeno nos peixes) induzido pelo Fsh, bem como a expressão gênica do *ar* (receptor de andrógeno) e da enzima esteroidogênica *cyp17a1*.

1.6. Alteração do estado da tireoide: uma abordagem dos efeitos do hipotireoidismo no desenvolvimento e reprodução dos vertebrados

O uso de goitrogênicos - substâncias que dificultam a absorção de iodo, como PTU, perclorato e methimazole são comuns para entender os mecanismos dos Hts envolvidos no desenvolvimento geral do organismo, incluindo a reprodução (Sharma e Patinõ, 2013; Sharma et al., 2016).

O 6-n-propil-2- tiouracil (PTU) inibe a captação de iodo e a síntese de T4 pela tireoide e também a deiodinização periférica do hormônio T4 em T3 (Aires, 2008). Em roedores, o tratamento com este composto afeta o desenvolvimento da espermatogênese, desde o aumento da população das células de Sertoli no período neonatal (Cooke et al., 1994) até o desenvolvimento normal dos espermatócitos e espermátides (Sakai et al., 2004).

O perclorato bloqueia a captação de iodo no folículo tireoidiano (Sharma e Patinõ, 2013; Sharma et al., 2016). Estudos com peixes mostraram que o hipotireoidismo induzido pelo perclorato induziu a feminização das gônadas durante o desenvolvimento inicial em zebrafish (Mukhi e Patiño, 2007). O methimazole inibe a incorporação de iodo à tireoglobulina, o precursor dos hormônios tireoidianos (T4/T3). Esse composto não induziu a reversão sexual de macho para fêmea em zebrafish, porém promoveu um atraso na transformação do ovário em testículo (Sharma e Patinõ, 2013). O estudo desses compostos em peixes é ainda limitado aos estágios iniciais de desenvolvimento (Vancamp et al., 2018).

1.7. Hormônio Inibidor de Gonadotropina (GnIH)

O hormônio inibidor de gonadotropina (GnIH), neuropeptídeo hipotalâmico descoberto em codornas, está relacionado com a regulação dos processos reprodutivos através da inibição da síntese e secreção das gonadotropinas

(Tsutsui et al., 2010). Esse peptídeo pertence à família LPXRF-amida (X=L ou Q) e foi caracterizado como parte integrante do eixo HHG em muitos vertebrados (Tsutsui et al., 2013). Em mamíferos, por exemplo, foram identificados ortólogos do GnIH que exibem semelhante ação inibitória das gonadotropinas, como em codornas (Tsutsui et al., 2013).

Em peixes, ortólogos de GnIH exercem papel conflitante, pois apresentam ação estimulatória e inibitória na expressão, síntese e liberação das gonadotropinas em diferentes espécies (Ubuka e Parhar, 2018). Em goldfish GnIH foi responsável pela redução dos níveis plasmáticos de Lh (Zhang et al., 2010), porém em *Astyanax altiparanae* (Branco et al., 2018) não foram encontrados efeitos na expressão dos níveis de Fsh e Lh nos explantes hipofisários. Nesse mesmo estudo, o co-tratamento entre GnIH e GnRH mostram que o GnIH promoveu a diminuição das gonadotropinas (Fsh e Lh), exercendo papel regulatório no eixo reprodutivo, modulando as células hipofisárias e a ação do GnRH.

Adicionalmente, ortólogos de GnIH e seus receptores podem ser identificados nos tecidos periféricos, como nas gônadas de diferentes teleósteos, tais como zebrafish e tilápia (Zhang et al., 2010; Muñoz-Cueto et al., 2017; Fallah et al., 2019), sugerindo que esse neuropeptídeo é um potente regulador autócrino e parácrino na função reprodutiva. Em zebrafish, foi demonstrado que *in vitro* o GnIH reduziu a liberação de testosterona (Fallah et al., 2019). O co-tratamento com a gonadotropina coriônica humana (hCG), similar ao hormônio luteinizante (Lh), também foi utilizada nesse estudo para investigar o papel do GnIH na regulação da espermatogênese. Interessante, pois o tratamento com hCG estimulou a produção de testosterona e o aumento da população das

células haploides. Estes resultados demonstram a necessidade das gonadotropinas na regulação da produção de andrógenos para o desenvolvimento da espermiogênese. Diretamente nos testículos, a alta concentração de GnIH (1000 nM) aumentou o número de espermátides e espermatozoides.

Qi e colaboradores (2013), por exemplo, avaliaram *in vitro* os efeitos do GnIH na esteroidogênese de machos e fêmeas de goldfish (*Carassius auratus*). Nas fêmeas não houve mudanças nos níveis de estradiol. No entanto, os machos apresentaram aumento nos níveis de testosterona no plasma, o que indica que o peptídeo pode modular a síntese de andrógeno. Foi observado que o rg GnIH (recombinante de goldfish) estimulou a liberação das gonadotropinas e do hormônio de crescimento (GH) em salmão (*Oncorhynchus nerka*) (Amano et al., 2006). Porém, Zhang e colaboradores (2010) mostraram que rzf GnIH (recombinante de zebrafish) diminuiu os níveis plasmáticos de Lh em goldfish adulto. Segundo Muñoz-Cueto e colaboradores (2017) as diferenças fisiológicas encontradas nestes trabalhos podem ser devido ao uso inespecífico de recombinantes para mostrar os efeitos fisiológicos espécie-específica. Além do GnIH ser considerado um regulador do eixo reprodutivo, há indícios de que esse peptídeo também regula o eixo tireoidiano (HHT) (ver abaixo) (Tsutsui et al., 2018).

1.8. Interação do GnIH nos eixos HHG-HHT na regulação da reprodução

Segundo Tsutsui e colaboradores (2018) a atividade da tireoide está relacionada a alterações do eixo reprodutivo e ao desenvolvimento inicial da puberdade em mamíferos. Na revisão de Tsutsui e colaboradores (2018) foi

mostrado que as fêmeas de camundongos induzidas quimicamente ao hipotireoidismo com PTU apresentaram níveis de GnIH elevado e níveis mais baixos de gonadotropinas e estradiol, refletindo na puberdade tardia observada nestes animais. Isso ocorre porque neurônios hipotalâmicos que produzem GnIH também expressam os receptores dos hormônios tireoidianos (TR α e TR β) (Tsutsui et al., 2018).

Com base nesses experimentos, Kiyohara e colaboradores (2017) demonstraram que fêmeas de camundongos GnIH-KO e também tratadas com PTU não apresentaram atraso na puberdade, enquanto em fêmeas normais o hipotireoidismo retardou o início da puberdade. Dessa forma, o GnIH pode mediar a disfunção tireoidiana no desenvolvimento da puberdade. A hipótese sugerida é que o GnIH é um potente mediador da interação dos eixos HHG-HHT durante o desenvolvimento reprodutivo nos vertebrados, como ilustra a figura abaixo (Fig. 7).

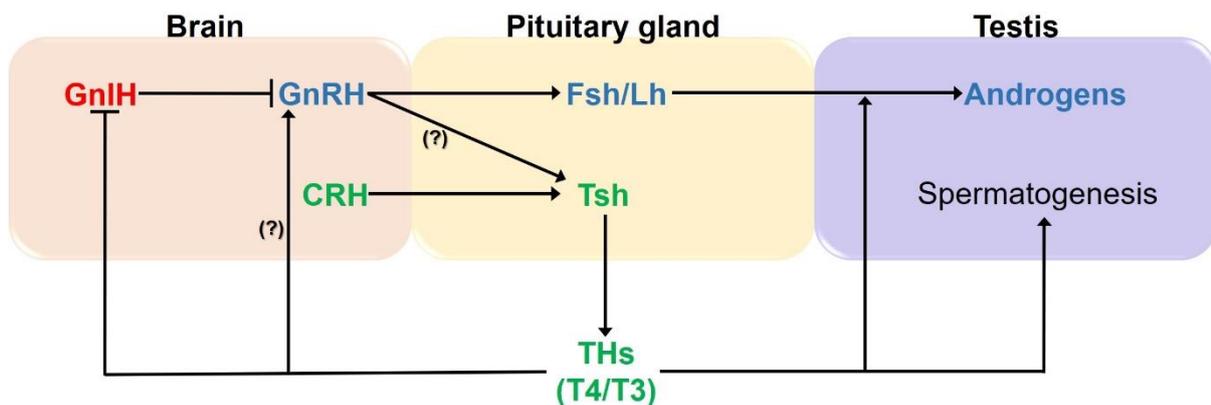


Figura 7: Efeitos dos hormônios tireoidianos (Hts) (T4/T3) no eixo reprodutivo de vertebrados. Altas concentrações de Hts inibem a síntese de GnIH (Hormônio inibidor das gonadotropinas). Na ausência dos Hts a expressão de GnIH aumenta. A interrogação (?) significa que os dados na literatura são inconclusivos sobre o papel regulatório entre GnRH e os Hts. Retirado de Tovo-Neto e colaboradores (2018).

1.9. O zebrafish como modelo biológico

O *Danio rerio* é um pequeno teleósteo de água doce originário da Índia, pertencente à família Cyprinidae e à ordem Cypriniformes, conhecido popularmente como zebrafish. Além do tamanho reduzido, esta espécie se destaca pelo fácil manejo em laboratório, podendo ser mantido em altas densidades populacionais, apresentando fertilização externa com geração de alto número de indivíduos e os embriões são transparentes, facilitando a visualização e monitoramento de seu desenvolvimento (Nasiadka e Clark, 2012). Além disso, este teleósteo possui uma vida média de três anos, com a primeira maturação podendo ocorrer nos primeiros três meses de vida, a temperatura média ideal para se reproduzirem varia de 27°C a 28°C, por aproximadamente 18 meses e a fêmea pode desovar em torno de 200-300 ovos semanalmente. Estas características credenciam esta espécie como um excelente modelo biológico para pesquisas científicas experimentais, seja na área da fisiologia, toxicologia ou endocrinologia (McGonnell e Fowkes, 2006).

O sequenciamento do genoma desta espécie, disponibilizado no site ZFIN (The Zebrafish Information Network - <https://zfin.org/>), despertou ainda mais o interesse da comunidade científica em utilizar este modelo como referência para inúmeras pesquisas, possibilitando que estudos genéticos também sejam aplicados neste teleósteo, inclusive a geração de excelentes modelos transgênicos na área da biologia da reprodução (McGonnell e Fowkes, 2006).

REFERENCES

- AMANO M, MORIYAMA S, IIGO M, KITAMURA S, AMIYA N, YAMAMORI K, UKENA K, TSUTSUI K. Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon. **J Endocrinol.** 188:417–423. 2006.
- BASSET, J.H.D., HARVEY, C.B., WILLIAMS, G.R. Mechanisms of thyroid hormone receptor specific nuclear and extra nuclear actions. **Mol. Cell. Endocrinol.** 213, 1–11. 2003.
- BLANTON, M.L., SPECKER, J.L. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. **Crit. Rev. Toxicol.** 37: 97–115. 2007.
- BROWN, D.D., CAI, L.Q. Amphibian metamorphosis. *Dev. Biol.* 306, 20–33. 2007.
- CARR, J.A., PATIÑO, R. The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in teleosts and amphibians: endocrine disruption and its consequences to natural populations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170: 299–312. 2011.
- CORDELLI, E., ELEUTERI, P., LETER, G., RESCIA, M., & SPANÒ, M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. **Contraception.** 72: 273–279. 2005.
- CASTAÑEDA CORTÉS, D.C., LANGLOIS, V.S., FERNANDINO, J.I. Crossover of the hypothalamic pituitary-adrenal/interrenal, -thyroid, and -gonadal axes in testicular development. **Front. Endocrinol.** 139: 1–11. 2014.
- CHIBA, H., AMANO, M., YAMADA, H., FUJIMOTO, Y., OJIMA, D., OKUZAWA, K., YAMANOME, T., YAMAMORI, K., IWATA, M. Involvement of gonadotropin-releasing hormone in thyroxine release in three different forms of teleost fish: barfin flounder, masu salmon and goldfish. **Fish Physiol. Biochem.** 30: 267–273. 2004.
- CYR, D.G., EALES, J.G. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 6: 165–200. 1996.
- DE GROEF, B., GORIS, N., ARCKENS, L., KÜHN, E.R., DARRAS, V.M. Corticotropin-releasing hormone (CRH)-induced thyrotropin release in directly mediated through CRH receptor type 2 on thyrotropes. **Endocrinology** 144: 5537–5544.2003.
- DENVER, R.J. Several hypothalamic peptides stimulate in vitro thyrotropin secretion by pituitaries of anuran amphibians. **Gen. Comp. Endocrinol.** 72: 383–393.1988.

FALLAH, H. P., TOVO-NETO, A., YEUNG, E. C., NÓBREGA, R. H., HABIBI, H. R. Paracrine/autocrine control of spermatogenesis by gonadotropin-inhibitory hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2019.

FARAONE-MENNELLA, M.R., FERONE, A., MARINO, L., CARDONE, A., COMITATO, R., VENDITTI, P., DI MEO, S., FARINA, B. Poly(ADP-ribosyl)ation of proteins and germ cell development in hyperthyroid rat testes. **Mol. Cell. Biochem**. 323: 119–129. 2008.

HUNT, D.W.C., EALES, J.G. The influence of testosterone propionate on thyroid function of immature rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 37: 115–121. 1979.

JACOBS, G.F.M., GOYVAERTS, M.P., VANDORPE, G., QUAGHEBEUR, A.M.L., KUHN, E.R. Luteinizing hormone-releasing hormone as a potent stimulator of the thyroidal axis in ranid frogs. **Gen. Comp. Endocrinol.** 70: 274–283. 1988a.

JACOBS, G.F.M., MICHELSEN, R.P., KUHN, E.R. Thyroxine and triiodothyronine in plasma and thyroids of the neotenic and metamorphosed axolotl *Ambystoma mexicanum*: influence of TRH injections. **Gen. Comp. Endocrinol.** 70: 145–151. 1988b.

LARSEN, D.A., SWANSON, P., DICKEY, J.T., RIVIER, J., DICKHOFF, W.W. In Vitro thyrotropin-releasing activity of corticotropin-releasing hormone-family peptides in Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 109: 276–285. 1998.

LEAL, M.C.; DE WAAL, P.P.; GARCIA-LOPEZ, A.; CHEN, S.X.; BOGERD, J.; SCHULZ, R.W. Zebrafish primary testis tissue culture: An approach to study testis function ex vivo. **General Comparative Endocrinology**, vol. 162, n. 2, p.134-138. 2009.

MACKENZIE, D.S., SOKOLOWSKA, M., PETER, R.E., BRETON, B. Increased gonadotropin levels in goldfish do not result in alterations in circulating thyroid hormone levels. **Gen. Comp. Endocrinol.** 67: 202–213. 1987.

MORAIS, R.D.V.S., NÓBREGA, R.H., GÓMEZ-GONZÁLES, N.E., SCHMIDT, R., BOGERD, J., FRANÇA, L.R., SCHULZ, R.W. Thyroid hormone stimulates the proliferation of sertoli cells and single type a spermatogonia in adult zebrafish (*Danio rerio*) Testis. **Endocrinology** 154: 4635–4676. 2013.

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

NÓBREGA, R.H.; MORAIS, R.D.V.S.; CRESPO, D.; WAAL, P.P.; FRANÇA, L.R.; SCHULZ, R.W.; BOGERD, J. Fsh Stimulates Spermatogonial Proliferation and Differentiation in Zebrafish via Igf3. **Endocrinology**. 156: 3804–3817. 2015.

OKADA, R., YAMAMOTO, K., KODA, A., ITO, Y., HAYASHI, H., TANAKA, S., HANAOKA, Y., KIKUYAMA, S. Development of radioimmunoassay for bullfrog thyroid-stimulating hormone (TSH): effects of hypothalamic releasing hormones on the release of TSH from the pituitary in vitro. **Gen. Comp. Endocrinol.** 135: 42–50. 2004.

OROZCO, A., VALVERDE, C.R., OLVERA, A., GARCÍA, C.G. Iodothyronine deiodinases: a functional and evolutionary perspective. **J. Endocrinol.** 215: 207–219. 2012.

PARHAR, I.S., SOGA, T., SAKUMA. Thyroid hormone and estrogen regulate brain region specific messenger ribonucleic acids encoding three gonadotropin-releasing hormone genes in sexually immature male fish, *Oreochromis niloticus*. **Endocrinology** 141: 1618–1626. 2000.

PAULLADA-SALMERÓN JA, COWAN M, ALIAGA-GUERRERO M, LÓPEZ-OLMEDA JF, MAÑANÓS EL, ZANUY S, et al. Testicular steroidogenesis and locomotor activity are regulated by gonadotropin inhibitory hormone in male European sea bass. **PLoS One.** 2016.

QI, X., ZHOU, W., LU, D., WANG, Q., ZHANG, H., LI, S., LIN, H. Sexual Dimorphism of Steroidogenesis Regulated by GnIH in the Goldfish, *Carassius auratus*. **Biology of Reproduction.** 2013.

ROY, P., DATTA, M., DASGUPTA, S., BHATTACHARYA, S. Gonadotropin-releasing hormone stimulates thyroid activity in a freshwater murrel, *Channa gachua* (Ham.), and Carps, *Catla catla* (Ham.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham.). **Gen. Comp. Endocrinol.** 117: 456–463.2000.

SAFIAN, D., MORAIS, R.D.V.S., BOGERD, J., SCHULZ, R.W. Igf Binding proteins protect undifferentiated spermatogonia in the zebrafish testis against excessive differentiation. **Endocrinology** 157: 4423–4433. 2016.

SWAPNA, I., RAJASEKHAR, M., SUPRIYA, A., RAGHUVEER, K., SREENIVASULU, G., RASHEEDA, M.K., MAJUMDAR, K.C., HAGAWA, H., TANAKA, H., DUTTA-GUPTA, A., SENTHILKUMARAN, B. Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish *Clarias gariepinus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 144: 1–10. 2006.

TSUTSUI, K., SON, Y. L., KIYOHARA, M., & MIYATA, I. Discovery of GnIH and Its Role in Hypothyroidism-Induced Delayed Puberty. **Endocrinology.** 159: 62–68. 2017.

TSUTSUI, K., SON, Y.S., KIYOHARA, M., MIYATA, I. Discovery of GnIH and its role in hypothyroidism-induced delayed puberty. **Endocrinology** 159: 62–68. 2018.

WAGNER, M.S., WAJNER, S.M., MAIA, A.N. Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis. **Microsc. Res. Tech.** 72: 796–808.2009.

ZHANG, Y.; LI, S.; LIU, Y.; LU, D.; CHEN, H.; HUANG, X. Structural diversity of the GnIH/GnIH receptor system in teleost: its involvement in early development and the negative control of LH release. **Peptides**. 31.1034–1043. 2010.

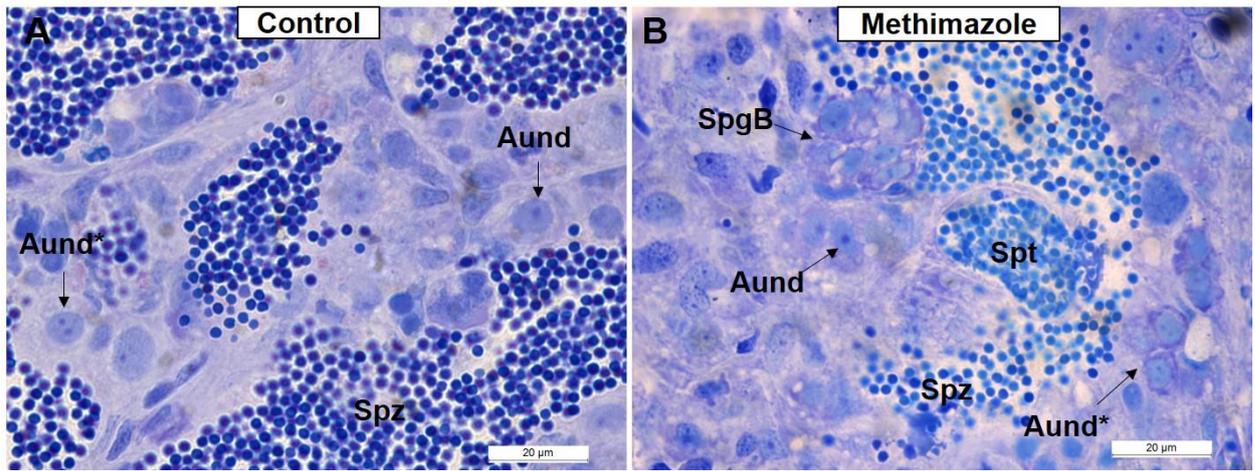


Figure 1 - Morphological sections from zebrafish testis after 7 days culture *in vitro* post methimazole-treatment for 21 days. **(A)**: control group **(B)**: methimazole treated group. type A undifferentiated spermatogonia (A_{und^*} and A_{und}), type B spermatogonia (SpgB), spermatids (Spt), spermatozoa (Spz). Staining: Toluidine blue. 100µm.

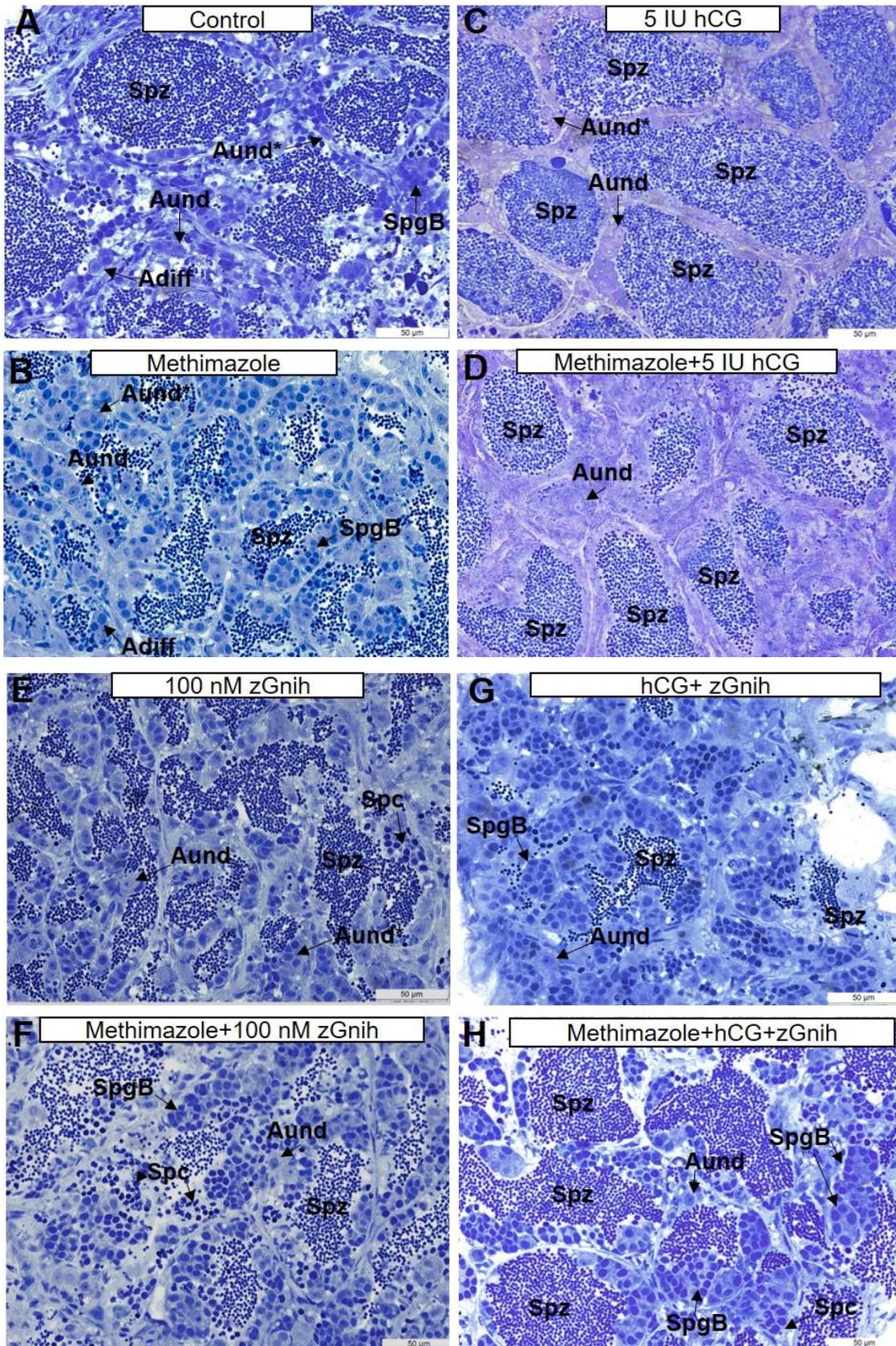
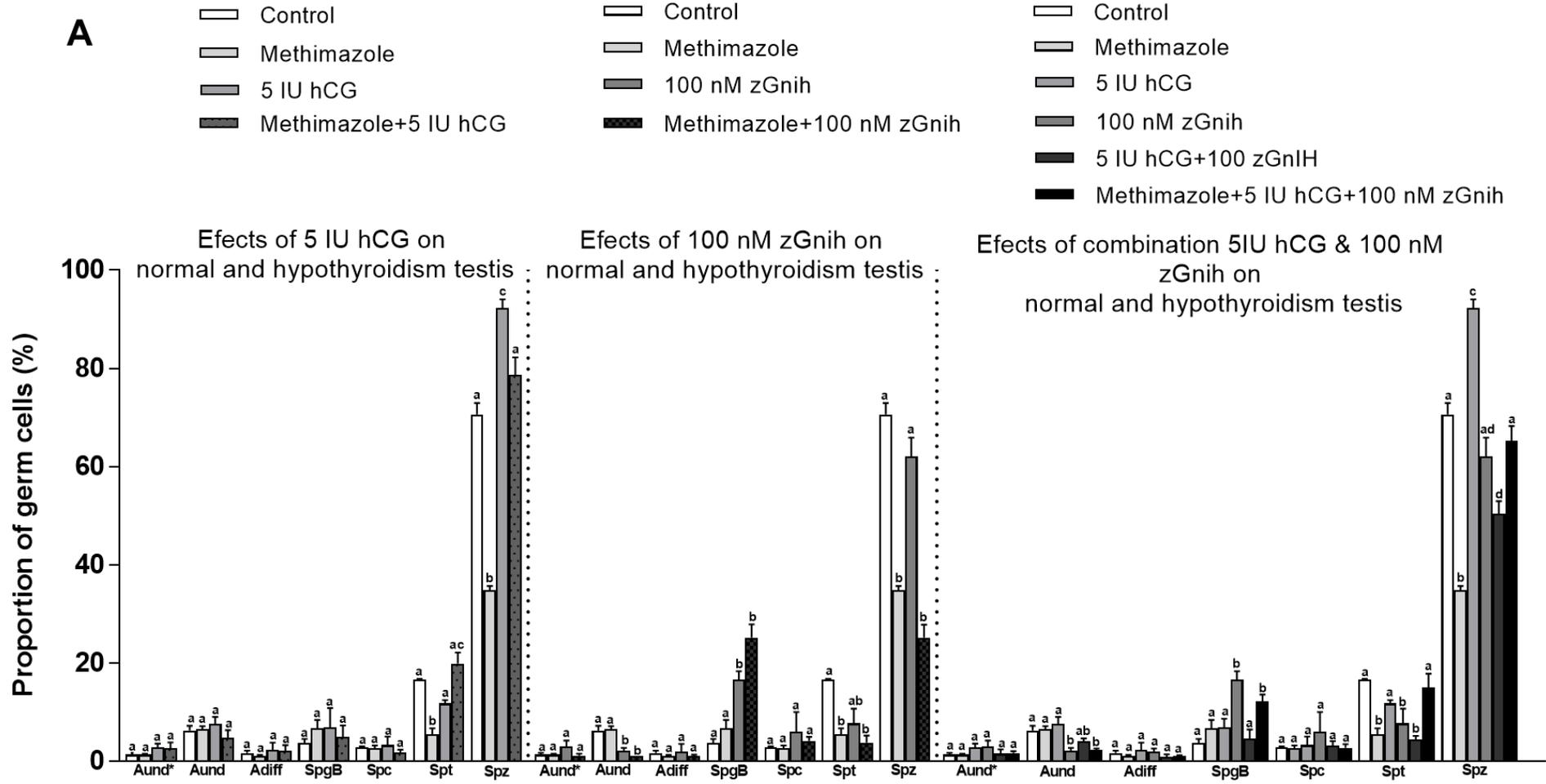


Figure 2 - Morphological sections from zebrafish testis after 7 days culture *in vitro* post methimazole-treatment for 21 days. **(A)**: control group **(B)**: methimazole treated group. **(C)**: 5 IU hCG alone. **(D)**: methimazole plus 5 IU hCG. **(E)**: 100 nM zGnih alone. **(F)**: methimazole plus 100 nM zGnih. **(G)**: 5 IU hCG plus 100 nM zGnih. **(H)**: methimazole plus 5 IU hCG & 100 nM zGnih. Type A undifferentiated spermatogonia (A_{und^r} and A_{und}), differentiated spermatogonia (A_{diff}), type B spermatogonia (SpgB), spermatocytes (Spc), spermatids (Spt), spermatozoa (Spz). Staining: Toluidine blue. 40 μ m.



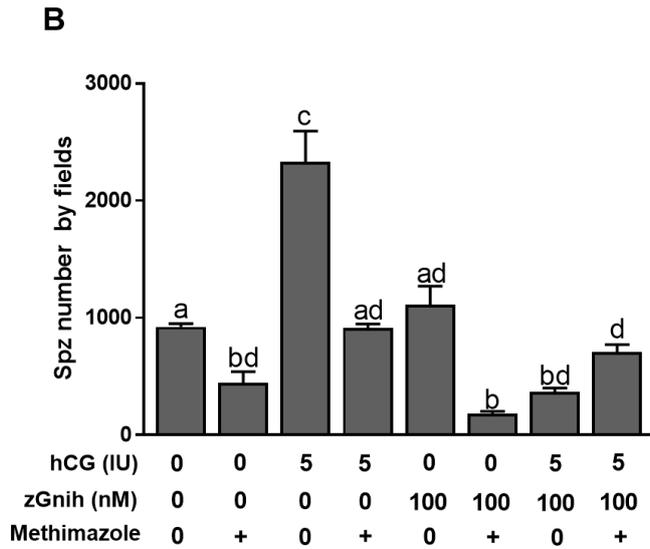


Figure 3 – (A) *In vitro* effects of 5 IU/mL hCG and zGnih (100nM) alone or in combination on population of germ cells on normal and hypothyroid zebrafish testis by morphometric analysis. Type A undifferentiated spermatogonia (A_{und^*} and A_{und}), differentiated spermatogonia (A_{diff}), type B spermatogonia (SpgB), spermatocytes (Spc), spermatids (Spt), spermatozoa (Spz) on histological points. **(B)** spermatozoa (Spz) number by fields of control and different treatments. Bars represent the mean \pm SEM. Different letters denote statistically different from the control ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $P \leq 0.05$).

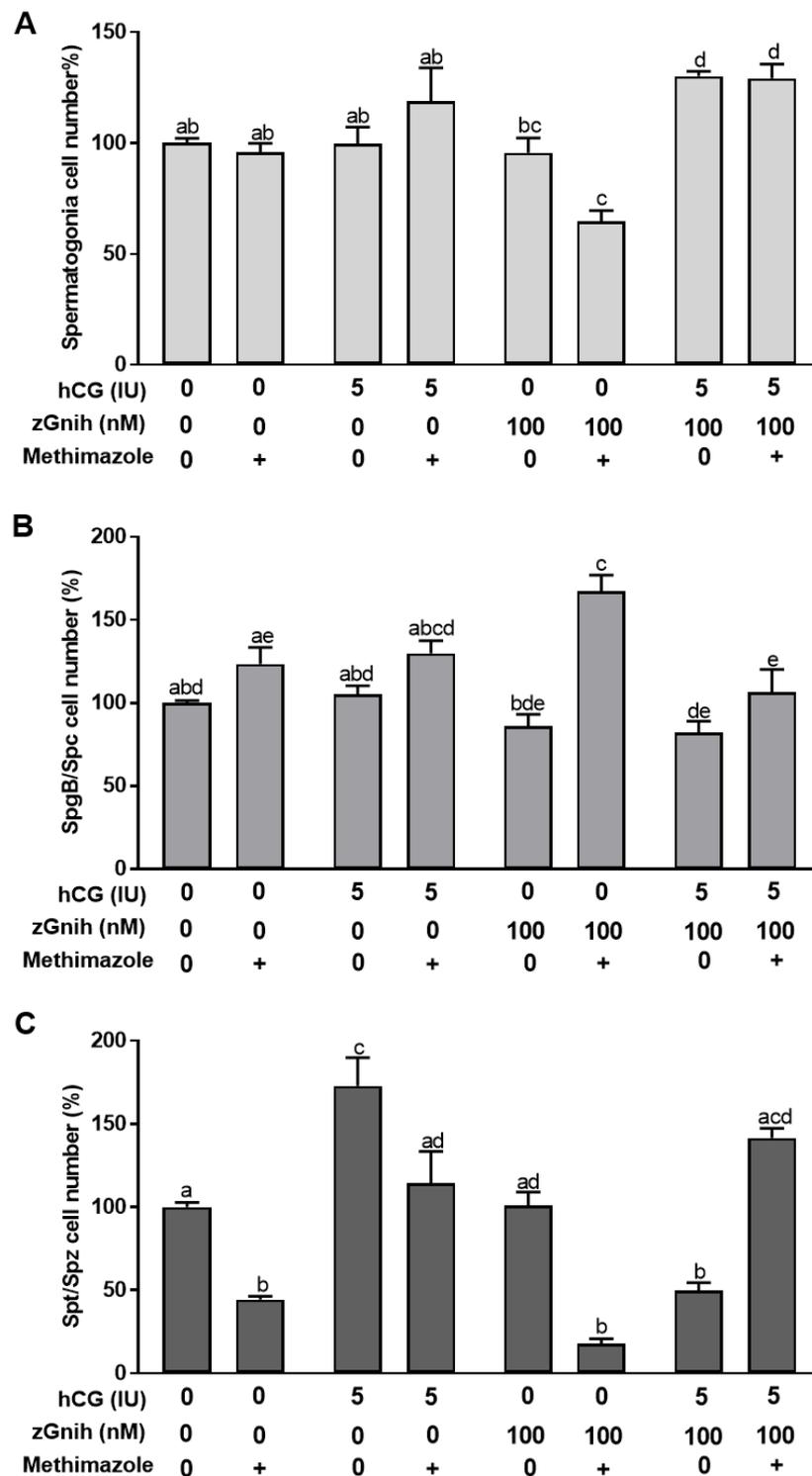


Figure 4 – A comparison of effects of hCG (5 IU/mL) and zGnih (100nM) alone or in combination on euthyroid and hypothyroid testis induced by methimazole on spermatogonia (undifferentiated and differentiated) **(A)**, B spermatogonia (SpG) and spermatocytes (SpC) **(B)**, spermatids (Spt) and spermatozoa (Spz) **(C)** in zebrafish testis. Following 7 days treatment *in vitro*, zebrafish testes were dissociated and assayed for cell cycle analysis. The percentage of different cell population were determined by FACScan analysis. Counts were normalized to 100%, and treatment groups were normalized against control (mean \pm SEM; n = 5) Different letters represent statistical significance between groups (ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $P \leq 0.05$).

7. CONCLUSÕES GERAIS

O papel dos hormônios tireoidianos (Hts) foram investigados *in vivo* e *in vitro* no eixo reprodutivo. Os dados mostrados na presente dissertação indicam a relação entre os eixos hipotalâmico-hipofisário-gonadal e tireoide (HHP-HHT) em machos adultos de zebrafish. Dessa forma:

1. Os hormônios tireoidianos são essenciais para a função testicular de adultos de zebrafish;
2. O hipotireoidismo induzido pelo methimazole afetou a espermatogênese de zebrafish levando ao acúmulo de células pré-meióticas, atraso na diferenciação e meiose, reduzindo a quantidade de espermatozoides formados;
3. O methimazole afeta o eixo hipotalâmico-hipofisário;
4. Os efeitos biológicos do Fsh na função testicular são dependentes dos hormônios tireoidianos;
5. Os hormônios tireoidianos são cruciais para os efeitos estimulatórios do hCG e inibitório do GnIH na regulação da espermatogênese de adultos de zebrafish.