

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

GnRH/GnIH e seus receptores no sistema olfatorinal de zebrafish.

Sheryll Yohana Corchuelo Chavarro

Jaboticabal, São Paulo

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

GnRH/GnIH e seus receptores no sistema olfato-retinal de zebrafish.

Sheryll Yohana Corchuelo Chavarro

Orientadora: Profa. Dr^a. Laura Satiko Okada Nakaghi

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega

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
2015

C793g Corchuelo, Sheryll Yohana Chavarro
GnRH/GnIH e seus receptores no sistema olfato-retinal de zebrafish / Sheryll Yohana Corchuelo Chavarro. -- Jaboticabal, 2015
x, 70 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2015

Orientadora: Laura Satiko Okada Nakaghi

Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Matias Pandolfi
Bibliografia

1. Teleósteo-Sistemas sensoriais. 2. Sistema GnRH/GnIH, 3. Teleósteo-Nervo terminal. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.31

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

“I should think we might fairly gauge the future of biological science, centuries ahead, by estimating the time it will take to reach a complete, comprehensive understanding of odor. It may not seem a profound enough problem to dominate all the life sciences, but it contains, piece by piece all the mysteries.”

—Lewis Thomas (1983)

Agradecimientos

Agradezco a toda mi familia por el apoyo constante. Especialmente a mi mamá Russelly por todo el esfuerzo y el apoyo incondicional que me brindaste en toda las etapas de esta experiencia. A mi papá Guillermo, mil gracias por apoyarme en todos los momentos y por toda tu alegría a pesar de las adversidades. A mi hermana Delany por animarme y apoyarme en los momentos difíciles del camino, gracias Pudi.

A mis abuelitas Beatriz, Gloria y a mi abuelito Elizar, por siempre tenerme en sus oraciones y siempre darme palabras de apoyo.

A mi esito Carlos Andrés Zambrano quien demostró con su amor y comprensión constante ser un compañero de vida. Gracias por apoyarme día a día.

A todo(a)s mis tías, tíos, primas y primos de las familias Corchuelo y Chavarro porque todos de alguna manera me ayudaron y contribuyeron con la realización de este sueño.

Agradezco especialmente el cariño de Norma Carvajal, Jaidive Cardozo y Juan Alejandro Garzón quienes en todas las etapas del camino me apoyaron y me animaron a luchar para alcanzar mis sueños.

Agradecimentos especiais

Á minha orientadora a Profa. Laura Satiko Okada Nakaghi pela confiança, paciência e ensinamentos. Estarei sempre agradecida com você por ter acreditado em mim sem me conhecer, é graças a você que hoje consigo terminar meu sonho de ser Mestre. Agradeço especialmente que além de ser uma excelente orientadora tornou-se uma mãe para mim em todo sentido e me ajudou em todas as etapas do caminho. Assim como agradeço ao Sr. Edson pelo constante apoio. Muito Obrigada!

Ao meu co-orientador Prof. Rafael Nóbrega, pela confiança e por acreditar no projeto desde o início. Agradeço o apoio constante ao longo dos experimentos e especialmente nas etapas finais com o auxílio na discussão. Obrigada por me acolher e disponibilizar todos os equipamentos e reagentes necessários para a realização desta dissertação. Obrigada pela exigência em todo momento, pois é isso o maior aprendizado que levo de você a sempre pensar além do normal, pensar que realmente somos capazes de realizar coisas grandes.

Á Fernanda Nogueira Valentin, que além de ser uma amiga verdadeira, considero realmente como uma irmã. Obrigada por todo o apoio e carinho nos dias difíceis, serei eternamente agradecida.

Á Daniela Fagotti Soares, quem além de ser uma amiga-irmã incrível me permitiu conhecer e conviver com sua família que agora considero como minha também. Obrigada Vivi (mamãe), Sebastião, Victor por abrir as portas de seu lar e de seus corações e me acolher durante estes anos. Agradeço as tias (Lourdes, Tiana e Natália) pelo imenso carinho. Assim como a Flaviana (Fu), Cassia, Mari, Evaldo (Raca) e especialmente a Catarina (Tupi) e a Vitoria pelas risadas e o carinho.

As amigas da Republica das Sete Mulheres, Fernanda, Daniela, Valquiria, Maria, Leticia, Andrea, Bruna, Ana, Kurral, Estelle: por todos os momentos felizes e pela amizade e companhia em todo momento. Agradeço especialmente a Maria e Regiane, pelo apoio e carinho constante.

A todos os colegas de laboratório (Lauretes), Nivaldo, Matheus, Cleo, Nariane, Breno, obrigada pela ajuda, risadas e amizade.

Ao Dr. Emanuel Martinez pela “co-co-orientação” e a constante ajuda nos experimentos do projeto.

A Juliana (Juju) e Arno (Fofura), pela amizade, as risadas e o companheirismo. Obrigada por alegrar todos meus dias em Botuca.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Melanie, Aldo, Andrés, Marcos, Gabriela, Lucas e a Pepi, obrigada pelo apoio e colaboração.

Ao Jose Eduardo pela colaboração no processamento das amostras.

As meninas da Republica Lactá, Cine, Berta, MiPega, Panela, Impina e Kole. Obrigada pelo apoio e compreensão.

Ao pessoal do Laboratório de peixes ornamentais pela ajuda e convivência.

Aos professores Dr. Ivan de Godoy Maia, Dr. Danilo Moretti-Ferreira, Dr. Cesar Martins e a professora Dra. Maeli Dal Pai, pela assistência técnica e estrutural.

À professora Dra. Maria Inês Borella, por gentilmente colaborar com alíquotas dos anticorpos utilizados no projeto.

À Chayrra Chehade Gomes pela imensa colaboração e a constante ajuda.

Ao professor Dr. Gustavo Somoza pela ajuda constante ao longo das diferentes etapas da dissertação.

À professora Dra. Elizabeth Criscuolo Urbinatti e ao professor Dr. Matias Pandolfi pelas valiosas sugestões dadas na ocasião da defesa.

Aos profissionais do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP – Jaboticabal, em especial, aqueles do Laboratorio de Histologia e ao histotécnico Sr. Orangi Mateus com os quais convivi durante todo esse período.

Aos profissionais do Laboratório de Microscopia da FMRP/USP – Ribeirão Preto, Maria Dolores Seabra Ferreira, Maria Tereza p. Maglia e José Augusto Maulin pelo processamento das amostras para microscopia eletrônica e a captura das electronmicrografias, todos muito atenciosos e prestativos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida (processo núm. 2014/02481-9).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) que me trouxe a oportunidade de ingressar no mundo da pós-graduação.

Sumário

CAPÍTULO I.....	1
1- Introdução Geral.....	1
1.1 Sistema olfatório	1
1.2 Hormônio liberador de gonadotropina (GnRH).....	2
1.2.1 Receptores de GnRH (GnRH-R).....	4
1.2.2 Modulação do GnRH no sistema olfatório e visual.....	4
1.3 Hormônio inibidor de gonadotropina (GnIH)	6
1.4 Zebrafish (<i>Danio rerio</i> , Hamilton).....	8
2 Referências	9
CAPÍTULO II	15
GnRH/GnIH e seus receptores no sistema olfato-retinal ao longo dos estágios de maturação ovariana em zebrafish.....	15
1. Introdução.....	16
2. Material e métodos	18
2.1 Animais e Amostras	18
2.2 Extração de RNA total e transcrição reversa.....	19
2.3 Amplificação dos genes por RT-PCR (reação da transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase)	19
2.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	20
2.5 Hibridização <i>in situ</i>	21
2.6 Immunomarcção do GnRH3.....	23
2.7 Análise estatística.....	23
3 Resultados	24
3.1 Expressão do <i>gnrh2</i> , <i>gnrh3</i> e seus receptores (<i>gnrhr1,2,3</i> e <i>4</i>).....	24
3.2 Distribuição do <i>gnrhr4</i> na retina do zebrafish.....	25
3.3 Distribuição dos transcritos primários de <i>gnih</i> , <i>gnrhr2</i> e <i>gnrhr4</i> no ovário de zebrafish.....	26

3.4	Imunomarcção do GnRH3 no epitélio olfatório	28
3.5	Imunomarcção do GnRH3 na retina	29
3.6	Imunomarcção do GnRH3 no ovário	30
3.7	Expressão do <i>gnrh2</i> , <i>gnrh3</i> , <i>gnih</i> , <i>gnrhr1</i> , 2, 3 e 4 no epitélio olfatório	31
3.8	Expressão do <i>gnrh2</i> , <i>gnrh3</i> , <i>gnih</i> , <i>gnrhr1</i> , 2, 3 e 4 no bulbo olfatório	34
3.9	Expressão do <i>gnrh2</i> , <i>gnrh3</i> , <i>gnih</i> , <i>gnrhr1</i> , 2, 3 e 4 na retina	35
3.10	Expressão do <i>gnrh2</i> , <i>gnrh3</i> , <i>gnih</i> , <i>gnrhr1</i> , 2, 3 e 4 no ovário	37
	Discussão	39
3.1	GnRH/GnIH no eixo epitélio olfatório-bulbo-retina de zebrafish	39
3.1.1	Epitélio olfatório	39
3.1.2	Bulbo olfatório	40
3.1.3	Retina	41
3.2	Ovário	42
5.	Conclusões finais	45
4	Referências	47
	ANEXO I	52
	GnRH/GnIH e seus receptores no testículo de zebrafish	52
	Imunomarcção do GnRH3 no testículo	52
	Expressão do <i>gnih</i> , <i>gnrhr2</i> e <i>gnrhr4</i> no testículo do zebrafish	53
	Expressão do <i>gnrh2</i> , <i>gnrh3</i> , <i>gnih</i> , <i>gnrhr1</i> , 2, 3 e 4 no testículo	54
	Discussão	54
	Referências	55

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Esquema da organização morfológica do epitélio olfatório e o bulbo olfatório dos teleósteos. Os axônios dos neurônios do receptor olfatório ciliados (NROc), microvilosos (NROm), e as células *crypt* (CC) convergem formando o nervo olfatório que finalmente inervava o bulbo olfatório em regiões conhecidas como glomérulos. Adaptado de: (Hamdani e Doving, 2007).....11

Figura 2. Representação esquemática da distribuição das três formas de GnRH no encéfalo dos teleósteos. Bulbo olfatório (BO), telencéfalo (Tel), lobo óptico (LO), hipotálamo (Hip), hipófise (H) e medula (M). Modificado de: (Sherwood et al., 1997).....13

Capítulo II

Figura 1. Expressão do GnRH (*gnrh2*, *gnrh3*), GnIH e os receptores (*gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3* e *gnrhr4*), nos diferentes tecidos (EN, encéfalo; RE, retina; GO, gônada; BO, bulbo olfatório e EO, epitélio olfatório) de zebrafish machos e fêmeas adultos. Amplificações do gene de β -actina foram realizadas para todos os tecidos como controle positivo.....33

Figura 2. Distribuição do *gnrhr4* na retina do zebrafish por ISH. (A) Secção transversal da retina mostrando presença dos transcritos primários de *gnrhr4* na camada nuclear externa (cne), camada nuclear interna (cni) e na camada de células ganglionares (ga) quando tecidos foram incubados com sondas de RNA anti-senso (T7). (B) Controle da ISH, no qual o tecido foi incubado com a sonda senso (T3). (C) Detalhe da marcação específica nos núcleos dos fotorreceptores (fo), das células amácrinas (am), bipolares (bi) e ganglionares (ga). Barras: A e B= 50 μ m; C= 25 μ m.....34

Figura 3. Distribuição dos transcritos primários de *gnih* no ovário de zebrafish. (A) Corte histológico do ovário incubado com sonda senso (T3). Notar a ausência de reações inespecíficas, o que comprova a especificidade da reação/sonda. (B,C) Expressão do *gnih* nos oócitos de estágio de alvéolo cortical, principalmente no interior dos alvéolos corticais (ac). Notar a ausência de expressão em outros oócitos, como perinucleolares e em vitelogenese. (D) Detalhe da expressão do *gnih* nas células foliculares (cf) da camada granulosa dos ovócitos vitelogênicos. Barras: A= 250 μ m; B= 100 μ m; C, D= 25 μ m.....35

Figura 4. Distribuição do *gnrhr2* e *gnrhr4* no ovário de zebrafish. (A) Expressão do *gnrhr2* nos oócitos perinucleolares (pe) e sua redução nos oócitos de alvéolo cortical (ac). (B,C) Detalhe da expressão do *gnrhr2* no citoplasma e no núcleo dos oócitos perinucleolares. (D-G) Cortes histológicos de ovário incubados com sonda senso (T3), mostrando a especificidade da reação. (E) Detecção dos transcritos primários de *gnrhr4*, sendo bastante e principalmente expresso nos oócitos perinucleolares (cabeça de setas). (F) Detalhe da expressão específica do *gnrhr4* no núcleo e citoplasma dos oócitos perinucleolares. (H) Localização específica do *gnrhr4* nas células foliculares e zona radiata dos oócitos vitelogênicos (cabeça de setas). Barras: A,D,E= 100 μ m; B,C= 15 μ m, D= 250 μ m; G,F= 25 μ m.....36

Figura 5. Imunodeteção do GnRH3 no epitélio olfatório de zebrafish. (A) Secção transversal mostrando a presença de fibras GnRH3 na lamina própria das lamelas olfatórias. Note a presença de fascículos de fibras GnRH3 positivas que darão origem ao nervo olfatório (seta preta). (B) Controle negativo obtido a partir da incubação dos anticorpos primários com a molécula sintética de GnRH. (C) Immunomarcagem das fibras GnRHergicas utilizando o anticorpo BB8 (seta preta). (D) Immunomarcagem das fibras GnRHergicas utilizando o anticorpo GF-6 (seta preta). (E) Controle negativo obtido pela omissão dos anticorpos primários. Notar que alguns cromatóforos (asteriscos) também estão presentes na lamina própria do epitélio. Barras: A e B= 250 μ m; C, D e E= 25 μ m.....37

Figura 6. Imunodeteção de GnRH3 no epitélio olfatório de zebrafish. (A) Secção transversal mostrando a marcação de GnRH3 na região apical do epitélio sensorial (cabeça de seta). (B) Controle negativo. (C) Detalhe da região apical dos neurônios do receptor olfatório (asteriscos), destacando especialmente os cílios

marcados (seta). (D) e (E) Detalhe dos fascículos de fibras GnRH3 positivas localizados entre as lamelas olfatórias, que posteriormente formarão o nervo olfatório (setas brancas). Barras: A e B= 25 µm; C= 10 µm; D e E= 25 µm.....38

Figura 7. Imunodeteção de GnRH3 na retina de zebrafish. Panorâmica da retina incubada com o anticorpo GF6 (A) e seus respectivos controles (omissão do anticorpo primário ou anticorpo neutralizado com seu peptídeo sintético alvo) (B). (C) Imunomarcção do GnRH3 utilizando o anticorpo BB8, mostrando as fibras marcadas na camada nuclear interna (cni), plexiforme externa (cpe) e fibras das células ganglionares que formam o nervo óptico (fno). (E) Imunomarcção de GnRH3 utilizando o anticorpo GF6, mostrando reatividade nas fibras das células ganglionares que formam o nervo óptico. Os controles (D e F) não apresentaram nenhuma marcação. Barras: A e B= 50 µm; C, D, E e F= 25 µm.....39

Figura 8. Imunodeteção de GnRH3 no ovário de zebrafish. (A) Corte transversal de um ovário de zebrafish, mostrando imunomarcção do GnRH3 nos oócitos perinucleolares (cabeças de seta) quando utilizado o anticorpo BB8. (B) Controle negativo (omissão do anticorpo primário ou anticorpo neutralizado com seu peptídeo sintético alvo). (C e D) Detalhe da intensa imunoreatividade ao GnRH3 no citoplasma dos oócitos perinucleolares (pe). Notar que, a imunomarcção do GnRH3 diminui no citoplasma dos oócitos em estágio de alvéolo cortical (ac). Barras: A e B= 100 µm; C, D= 25 µm.....40

Figura 9. (A) Morfologia do ovário nos diferentes estágios de maturação. CP, crescimento primário (ovário com abundantes oócitos perinucleolares (pe)); PV, pré-vitelogênese (ovário apresenta numerosos oócitos em estágio de alvéolo cortical (ac) assim como oócitos perinucleolares; VI, vitelogênese intermediária (ovário apresenta oócitos em vitelogênese inicial (vi) e alguns alvéolos corticais) e VT vitelogênese tardia (ovário composto principalmente por oócitos vitelogênicos(v)). Barra 500µm. (B) Expressão dos *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1*, *2*, *3*, *4* no epitélio olfatório de fêmeas de zebrafish em quatro estágios de maturação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.....41

Figura 10. Expressão dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no epitélio olfatório de fêmeas de zebrafish por estágio de maturação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os genes ligantes (*gnrh2*, *gnrh3* e *gnih*) e os receptores (*gnrhr1,2,3,4*). CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia.....42

Figura 11. Expressão do *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no bulbo olfatório de fêmeas de zebrafish em quatro estágios de maturação. CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.....43

Figura 12. Expressão dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no bulbo olfatório de fêmeas de zebrafish por estágio. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os genes ligantes (*gnrh2*, *gnrh3* e *gnih*) e os receptores (*gnrhr1,2,3,4*). CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia.....44

Figura 13. Expressão dos *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* na retina de fêmeas zebrafish em quatro estágios de maturação. CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.....45

Figura 14. Expressão dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* na retina de fêmeas de zebrafish por estágio. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os genes ligantes (*gnrh2*, *gnrh3* e *gnih*) e os receptores (*gnrhr1,2,3,4*). CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia.....46

Figura 15. Expressão dos *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no ovário zebrafish em quatro estágios de maturação. CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e

VT vitelogênese tardia. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.....47

Figura 16. Expressão por estágio dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no ovário de zebrafish. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os genes ligantes (*gnrh2*, *gnrh3* e *gnih*) e os receptores (*gnrhr1,2,3,4*). CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia.....47

Figura 17. GnRH/GnIH e seus receptores no sistema olfato-bulbo-retinal de zebrafish. Destacando a presença de GnRH3 (●) na região apical do epitélio olfatório assim como em diferentes camadas da retina em contato com os fotorreceptores (verdes), células amácrinas (amarelo), bipolares (vermelho) e as células ganglionares (azul). Destacam-se também os genes mais expressos em cada tecido ao longo da maturação gonadal. No bulbo, existe uma relação inversa de expressão entre *gnih* e *gnrh3*, onde sugere-se que o *gnih* provavelmente suprime a expressão do *gnrh3*, como mostra a seta vermelha inibitória. Embaixo de cada tecido se destacam os genes que foram mais expressos ao longo da maturação gonadal.....54

ANEXO II

Figura 1. Expressão do *gnih*, *gnrhr2* e *gnrhr4*-RNAm no testículo do zebrafish. (A) Controle negativo obtido incubando os tecidos com a sonda senso. (B) Marcação do *gnih* nas células germinativas em diferentes estágios, assim como compartimento intersticial (asterisco). (C) Detalhe da forte marcação do *gnih* nas espermatogônias e no compartimento intersticial (asterisco). (D) Marcação do *gnrhr1* nas células germinativas. (E,F) Expressão do *gnrhr4* nas espermatogônias (spg), e outras células germinativas. Barras: A,B= 100 μ m; C= 25 μ m; D,E= 15 μ m; E= 20 μ m.....62

Figura 2. Imunodeteção do GnRH3 no testículo de zebrafish. (A) Corte histológico de um testículo de zebrafish, mostrando ampla imunorreatividade ao GnRH3. (B) Controle negativo (omissão do anticorpo primário ou anticorpo neutralizado com seu peptídeo sintético alvo). (C) Imunomarcação do GnRH3 utilizando o anticorpo GF6. Notar imunorreatividade do GnRH3 nas células de Leydig (le), no citoplasma das Sertoli (se) e nas gerações espermatogônias (spg). (D) Imunomarcação do GnRH3 utilizando o anticorpo BB8; notar intensa imunorreatividade no citoplasma das diferentes gerações espermatogoniais (spg). Barras: A= 100 μ m; B, C, D= 25 μ m.....63

Figura 3. Expressão dos *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no testículo zebrafish. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.64

Lista de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1. Especificações dos primer utilizados na RT-PCR.....29

Tabela 2. Especificações dos primer utilizados na qPCR.....30

Tabela 3. Especificações das sondas utilizadas, destacando as regiões promotoras das sondas

T7 (vermelho) e T3 (azul).....31

Resumo Geral

O hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) é um dos fatores chaves na regulação neuroendócrina da reprodução dos vertebrados. Alguns peixes apresentam três variantes do GnRH: o GnRH1 envolvido na secreção de gonadotropinas, o GnRH2 que regula o comportamento alimentar e sexual e o GnRH3 expresso no bulbo olfatório e o nervo terminal cujas fibras nervosas inervam a retina e o epitélio olfatório. O zebrafish possui duas variantes do GnRH (GnRH2 e GnRH3), sendo o GnRH3 a variante hipofisiotrófica. Estudos mostram possível envolvimento do GnRH no sistema olfato-retinal. No sistema olfatório o GnRH regula a sensibilidade na detecção de alimento, o reconhecimento intra e interespecífico, entre outros. Na retina, o GnRH3 pode estar envolvido na acuidade visual e do processamento de informação da retina. Existem estudos que reportam a presença de receptores de GnRH em diferentes camadas da retina, no entanto ainda não é clara a presença de receptores no epitélio olfatório. Neste contexto, no presente estudo analisamos a localização do *gnrh2*, *gnrh3* e seus receptores (*gnrhr1,2,3 e 4*) e do *gnih* (hormônio inibidor de gonadotropinas) no epitélio olfatório, a retina e o bulbo olfatório de machos e fêmeas adultos e comparamos a expressão destes genes em fêmeas em diferentes estágios de maturação gonadal. Para tanto, o RNA total do epitélio olfatório, retina, bulbo olfatório, cérebro e gônadas foi extraído. Com base na sequência dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3* e *gnrhr4*, primers forward e reverse foram desenhados para RT-PCR e qPCR. Sondas para a hibridização *in situ* também foram construídas para verificar os sítios de expressão destas moléculas no epitélio olfatório, retina e gônadas. Imunohistoquímica com os anticorpos anti-GnRH3 (BB8 e GF6) foram realizadas para localizar a proteína do GnRH3 nos tecidos analisados. O presente estudo apresenta um panorama da expressão do sistema GnRH/GnIH e seus receptores no eixo epitélio olfatório-bulbo e olfatório-retina ao longo dos estágios de maturação gonadal em fêmeas de zebrafish. Os resultados mostram que no epitélio olfatório há um aumento na expressão dos receptores de GnRH nos estágios finais de maturação ovariana. O epitélio olfatório apresenta GnRH3 no citoplasma dos neurônios do receptor olfatório, assim como nos cílios destas células e também nas fibras do nervo olfatório. No bulbo olfatório, interessante, encontramos uma relação inversa entre a expressão de *gnih* e *gnrh3* em todos os estágios de maturação gonadal. Na retina, os sítios de expressão do receptor *gnrhr4* ocorrem nos núcleos das células amácrinas, bipolares e ganglionares, onde também foram observadas fibras positivas ao GnRH3. Nas gônadas femininas, o GnRH3 e seus receptores (*gnrhr2* e *gnrhr4*) ocorrem em oócitos perinucleolares, enquanto que o *gnih* em oócitos em estágio de alvéolo cortical. Nas gônadas masculinas, o GnRH3 e seus receptores (*gnrhr1* e *gnrhr4*) ocorrem em células germinativas (principalmente na gerações espermatogoniais), células

de Sertoli e células de Leydig, enquanto que o *gnih* é amplamente expresso nas células germinativas e células intersticiais. O presente trabalho, de forma inédita, apresenta as variações na expressão gênica do sistema *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, e das diferentes isoformas do receptor de GnRH (*gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3* e *gnrhr4*) nos três componentes do sistema olfato-retinal assim como nos ovários, sugerindo que o sistema GnRH/GnIH possa estar envolvido na neuromodulação dos sistemas sensoriais (olfatório e visual) especialmente nos estágios finais da maturação assim como a possível regulação dos processos de esteroidogênese e gametogênese nas gônadas do zebrafish.

Palavras chave: sistemas sensoriais, GnRH, GnIH, nervo terminal.

Abstract

The gonadotropin releasing hormone (GnRH) is one of the key factors involved in the neuroendocrine regulation of vertebrate reproduction. Some fish species have three GnRH variants: GnRH1 involved in gonadotropin secretion, GnRH2 regulating food and sexual behaviors and the GnRH3 which is expressed in the olfactory bulb and terminal nerve whose fibers innervate the retina and the olfactory epithelium. Two GnRH variants (GnRH2 and GnRH3) are present in the zebrafish, in which GnRH3 acts as the hypophysiotrophic variant. Recent studies have been showing the role of GnRH in the olfactory-retinal system. In the olfactory system, GnRH regulates food detection, and intra and interspecific recognition. In retina, GnRH3 may be involved in visual acuity modulation and retinal processing information. Moreover, studies have reported the presence of GnRH receptors in the retina, but not yet in the zebrafish olfactory epithelium. Therefore, the current study analyzed the presence of GnRH2, GnRH3 and its receptors (GnRH-R1,2,3 and 4) and GnIH (gonadotropin inhibitory hormone) in the olfactory epithelium, olfactory bulb, retina and in gonads of adult zebrafish. We also compared the expression of these genes during the different stages of ovarian maturation in zebrafish. For that, total RNA of the olfactory epithelium, olfactory bulb, retina and gonads was extracted with the PureLink® RNA Mini Kit(Ambion®). RT-PCR and qPCR analysis were performed using forward and reverse primers for *gnrh2*, *gnrh3*, *gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3*, *gnrhr4* for . Probes for in situ hybridization were constructed to verify the expression sites of these molecules in the olfactory epithelium, retina, and gonads. Immunohistochemistry using anti-GnRH3 antibodies (BB8 and GF6) were performed to identify the GnRH3 protein in these tissues. The current study presents a general expression view of GnRH/GnIH and their receptors in the olfactory epithelium-olfactory bulb-retinal axis during the female gonadal maturation in zebrafish. Our results showed an increase of GnRH receptor transcripts in the olfactory epithelium at the final stages of ovarian maturation. The olfactory epithelium exhibited GnRH3 in the cytoplasm of the olfactory receptor neurons, as well as the cilia of these cells and also in the olfactory nerve fibers. Interestingly, we found an inverse expression pattern for *gnih* and *gnrh3* in the olfactory bulb, in all maturation stages. In the retina, *gnrhr4* expression was found in the nuclei of amacrine, bipolar, and ganglion cells, where GnRH3 positive fibers could also be observed nearby to *gnrhr4* expressing cells. In the female gonads, GnRH3 and their receptors (*gnrhr2* and *gnrhr4*) were found in perinucleolar oocytes, whereas *gnih* in the cortical alveolus oocytes. In testis, GnRH3 and their receptors (*gnrhr1* and *gnrhr4*) occur in germ cells (mainly in spermatogonial generations), Sertoli cells and Leydig cells, whereas *gnih* is widely expressed in germ cells and interstitial cells. This work describes for the first time the changes of *gnrh2*,

gnrh3, *gnih* and the different GnRH receptor isoforms (*gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3*, *gnrhr4*) expression in the three components of olfactory-retinal system, and in the ovary as well. Our results suggest that GnRH / GnIH system is involved in the neuromodulation of the sensorial system particularly at the final stages of maturation. We also address a possible role of GnRH/GnIH in steroidogenesis and gametogenesis processes in zebrafish gonads.

Key words: sensorial systems, GnRH, GnIH, terminal nerve.

CAPÍTULO I

1- Introdução Geral

1.1 Sistema olfatório

Em vertebrados, os sistemas olfatório e gustativo são os principais centros sensoriais envolvidos na detecção e identificação de estímulos químicos presentes no ambiente. Estes sistemas estão intimamente relacionados com os processos de alimentação, reprodução, fuga de predadores, migração, cuidado parental entre outras interações intra e interespecíficas fundamentais na vida dos organismos (Hara e Zielinski, 2007).

Alguns desses processos são mediados por diferentes tipos de moléculas, sendo as mais estudadas: 1) Aminoácidos (cisteína, arginina, prolina, serina, entre outros) que são conhecidos na sinalização de alimentos (Hansen et al., 2003). Contudo, também parecem estar envolvidos no comportamento de migração, como no caso do salmão Chum *Oncorhynchus keta* (Yamamoto e Ueda, 2009). Tais aminoácidos também podem atuar como feromônios sexuais em *Oncorhynchus masou* (Yambe et al., 2006) e carpa comum *Cyprinus carpio* (Lim e Sorensen, 2011). 2) Sais biliares que transmitem intra e interespecificamente a informação social e o estado endógeno do animal. 3) Esteroides sexuais (androstenediona, 17 β -estradiol) e prostaglandinas (PGF2 α e 17,20 β -P). Quando esses hormônios sexuais são liberados na água atuam como feromônios, induzem diferentes respostas endócrinas (ovulação, espermição) e comportamentais (cortejo, comportamento sexual) (Sorensen et al., 1991).

O processo olfatório inicia quando odorantes presentes na água entram na cavidade nasal e interagem com os receptores presentes nos neurônios receptores olfatórios (NROs). A interação desses odorantes com os receptores dos NROs inicia uma reação em cascata que transmite um sinal elétrico diretamente ao bulbo olfatório (BO) (Hara, 2000; Hara e Zielinski, 2007). Nos teleósteos, a roseta olfatória localizada dentro da cavidade olfatória apresenta uma série de lamelas originadas desde a base da cavidade (Sorensen et al., 1991). As lamelas são compostas por dois tipos de epitélio: sensorial (epitélio pseudoestratificado ciliado) e epitélio não sensorial (epitélio colunar). Este último tipo de epitélio contém células mucosas ciliadas não sensoriais e células basais indiferenciadas. As células basais estão relacionadas com a regeneração das NROs e o crescimento do órgão com a idade. Capacidade de regeneração que dependerá parcialmente do contato dessas células com o BO, o qual gera fatores de maturação e sobrevivência para esses

neurônios (Schowb, 2002).

Além das células de suporte e células basais, o epitélio sensorial está composto por três tipos de NROs: ciliados (NROc), microvilosos (NROm) e as células *crypt* (CC) (Figura 1). Estudos relatam que cada tipo de NROs detecta uma molécula específica (Hara, 1994; Laberge e Hara, 2001; Hamdani e Doving, 2007). NROc, aminoácidos e sais biliares; NROm, feromônios, nucleotídeos e aminoácidos (Specca et al., 1999; Sato e Suzuki, 2001; Hansen et al., 2003) e CC feromônios sexuais (Hamdani e Doving, 2002; Lastein et al., 2006).

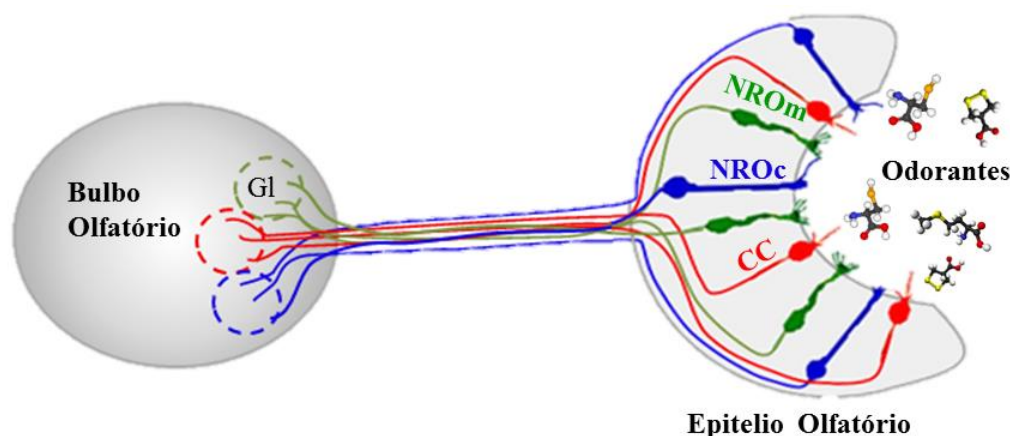


Figura 1. Esquema da organização morfológica do epitélio olfatório e o bulbo olfatório dos teleostes. Os axônios dos neurônios receptores olfatórios ciliados (NROc), microvilosos (NROm), e as células *crypt* (CC) convergem formando o nervo olfatório que finalmente inervava o bulbo olfatório em regiões conhecidas como glomérulos. Adaptado de: (Hamdani e Doving, 2007).

1.2 Hormônio liberador de gonadotropina (GnRH)

Os esteroides sexuais são fundamentais na modulação da fisiologia dos neurônios envolvidos no comportamento reprodutivo (Cross e Roselli, 1999; Gabor e Grober, 2010). Nos vertebrados, o crescimento e a reprodução são regulados pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, onde o hormônio liberador de gonadotropina GnRH, (decapeptídeo sintetizado principalmente por células neuro-secretoras da área pre-óptica hipotalâmica) é estocado em vesículas e liberado diretamente nas células gonadotrópicas na hipófise. O GnRH estimula a síntese e liberação das gonadotropinas hipofisárias, Fsh (hormônio folículo estimulante) e Lh (hormônio luteinizante), que controlam a gametogênese e a esteroidogênese gonadal (Chen e Fernald, 2008).

Em termos gerais, a estrutura do GnRH (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) apresenta dois domínios altamente conservados: o amino-terminal (pGlu-His-Trp-Ser) e o carboxil-terminal (Pro-Gly-NH₂), regiões diretamente envolvidas na ligação e ativação de seu receptor (Millar e Newton, 2013). Quatro dos dez resíduos (posições 1, 4, 9 e 10) são altamente

conservados entre as diferentes formas de GnRH descritas, entretanto as posições restantes (5,7 e 8) são variáveis, e portanto, importantes na ligação específica dos seus receptores (Millar, 2005).

Inicialmente, o nome das formas de GnRH foi dado de acordo a espécie de origem onde ele foi isolado. No entanto, devido ao crescente número de formas descritas atualmente é usada uma classificação filogenética que distingue as formas de acordo com sua localização e função: tipo 1 (GnRH1), tipo 2 (GnRH2) e tipo 3 (GnRH3), sendo a última exclusiva de alguns teleósteos (White e Fernald, 1998). O GnRH1 se expressa na área peoptica do encéfalo e está relacionado com a secreção das gonadotropinas (Schwanzel-Fukuda e Pfaff, 1990). O GnRH2 se expressa no encéfalo medio e se relaciona com a regulação do comportamento sexual, alimentar (Sherwood et al., 1997) e no caso de algumas espécies apresenta também funções hipofisiotróficas junto ao GnRH3 (Lethimonier et al., 2004). Finalmente, o GnRH3 é expresso principalmente no bulbo olfatório e no nervo terminal e está relacionado com a regulação dos mecanismos neurais do comportamento sexual (Eisthen et al., 2000; Biju et al., 2003; Biju et al., 2005) como: a construção de ninho de bolhas pelo macho de *Colisa lalia* (Yamamoto et al., 1997), a migração e desova do salmão (Onuma et al., 2005), entre outros. No caso das espécies de peixes como alguns salmonídeos e o zebrafish que possuem duas formas do GnRH (GnRH2 e GnRH3), a forma tipo 3 se expressa na região ventral do prosencéfalo como o GnRH1 (Figura 2) (Parhar e Iwata, 1994; Abraham et al., 2009).

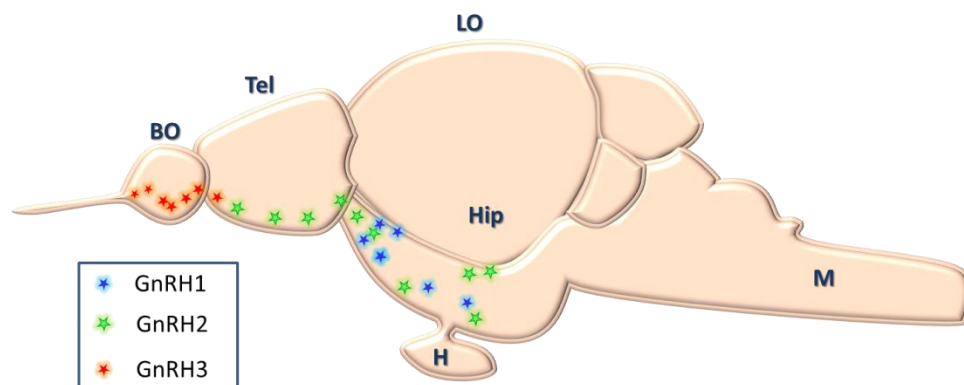


Figura 2. Representação esquemática da distribuição das três formas de GnRH no encéfalo dos teleósteos. Bulbo olfatório (BO), telencéfalo (Tel), lobo óptico (LO), hipotálamo (Hip), hipófise (H) e medula (M). Modificado de: (Sherwood et al., 1997).

A localização do GnRH não se restringe ao encéfalo, podendo também ser encontrado em outros tecidos como: músculo, coração, fígado, rim, placenta e gônadas (Pati e Habibi, 2002; González-Martínez et al., 2006). Dentre estes tecidos, destaca-se o possível papel do GnRH nas

gônadas na regulação dos processos de esteroidogênese e na regulação da meiose nas gônadas femininas (Pati e Habibi, 2002). No caso das gônadas masculinas, o GnRH parece estar relacionado no controle da proliferação de células germinativas e da espermatogênese (Andreu-Vieyra e Habibi, 2001).

1.2.1 Receptores de GnRH (GnRH-R)

Os receptores de GnRH (GnRH-R) pertencem a superfamília de receptores acoplados a proteínas G, que apresentam sete domínios transmembranais de hélices alfa hidrofóbicas ligadas por loops hidrofílicos extra e intracelulares (Chen e Fernald, 2008). Os domínios transmembranais extracelulares e as regiões superficiais são geralmente os responsáveis pela ligação ao ligante, especialmente o terceiro loop extracelular (Millar, 2005). Os GnRH-R apresentam um domínio extracelular N-terminal e um domínio citoplasmático C-terminal. Sugere-se que os loops intracelulares e o domínio C-terminal regulam diversas funções como a transdução dos sinais, a ligação de proteínas G, entre outras (Levavi-Sivan e Avitan, 2005; Millar, 2005).

Contrastando com as relações filogenéticas entre os três ligantes de GnRH, os receptores de GnRH apresentam um passado evolutivo complexo (Chen et al., 2006). Anteriormente, autores classificaram os GnRH-R em três classes relacionadas com ligantes particulares segundo a organização do gene e a estrutura do C-terminal (Millar et al., 2004). No entanto estudos posteriores demonstraram que os GnRH-R são promíscuos e a ligação específica aos ligantes não foi completamente suportada. Posteriormente Flanagan e colaboradores (2007) agruparam os receptores de GnRH em quatro subfamílias (GnRH-Ra1, GnRH-Ra2, GnRH-Rb1 e GnRH-Rb2), segundo as relações filogenéticas de uma região conservada de três aminoácidos no terceiro loop extracelular (Chen e Fernald, 2008).

1.2.2 Modulação do GnRH no sistema olfatório e visual

O nervo terminal (NT) é o nervo cranial mais anterior que se estende desde a cavidade nasal e a retina até o cérebro posterior (Fritsch, 1878). Nos teleósteos o NT é composto por um agrupamento de células localizadas entre o bulbo olfatório (BO) e o telencéfalo (Yamamoto et al., 1995) ou só no BO de acordo com a espécie (Muske, 1993). Estudos sugerem que o NT tem uma função neuromoduladora (Eisthen et al., 2000; Park e Eisthen, 2003; Abe e Oka, 2007; Kawai et al., 2009), pois as fibras deste possuem peptídeos moduladores como o peptídeo FMRFamida, o

GnRH (Maaswinkel e Li, 2003) e o neuropeptídeo Y (Chiba, 2005), além de estar envolvido no controle do estado de motivação do animal (Yamamoto et al., 1997). Os neurônios do NT inervam a região telencefálica dorsal e ventral, o hipotálamo, o cérebro médio, o torus semicircularis, o tectum óptico, o BO, a medula, o epitélio olfatório (EO) e a retina (Abe e Oka, 2007), portanto considera-se que o sistema do NT recebe sinais visuais, olfatórios e somatosensoriais (Yamamoto e Ito, 2000). Vários estudos destacam a importância da presença do GnRH no NT na regulação da acuidade visual (Maaswinkel e Li, 2003) e a sensibilidade do epitélio olfatório (Kawai et al., 2009).

As fibras do NT que inervam a retina estão em contato sináptico direto com dois tipos celulares: as células interplexiformes envolvidas na liberação e a regulação de dopamina nas camadas plexiformes da retina e as células amácrinas responsáveis pela detecção rápida de variações luminosas (Fernald, 2000). Assim o GnRH que é liberado nas regiões inervadas regula o sistema dopaminérgico da retina, este sistema modula os processos de adaptação luminosa, a regulação do movimento retinomotor (Donatti e Fanta, 2007), a regulação da resposta das células ganglionares e horizontais e a modulação do processamento de informação lateral e vertical da retina (Umino e Dowling, 1991). Estudos recentes demonstram a presença dos receptores dI GnRHR-II-2b e dI GnRHR-II-1a na camada nuclear interna e externa da retina de *Dicentrarchus labrax*, além de fibras positivas para GnRH3 na camada de células ganglionares. Estes fatos sugerem que as fibras GnRH3 que inervam estas camadas podem secretar o peptídeo e este atingir diferentes tipos celulares de uma maneira parácrina, mecanismo que poderia melhorar a amplitude e duração da neuromodulação nas diferentes camadas da retina (Servili et al., 2012).

Quanto a relação neuromoduladora do sistema GnRH-NT sobre o sistema olfatório, sugere-se que o GnRH modula a atividade do sistema olfatório na detecção de alimento, acasalamento e no reconhecimento inter e intraespecífico (Kawai et al., 2009). Especificamente parece que o GnRH estimula a acuidade olfatória motivando o animal a responder de maneira adequada aos estímulos ambientais. Além disso, é possível que esta modulação melhore a capacidade de detectar feromônios e outras moléculas fundamentais para obter uma reprodução com grande sucesso (Kawai et al., 2009). Estudos realizados por Eisthen *et al.* (2000) e Zhang e Delay (2007), em salamandras, demonstram que a resposta dos NROs ao GnRH é duas vezes maior na época reprodutiva comparada com a não reprodutiva. Além disso, Propper e Moore (1991) encontraram que os níveis de GnRH do nervo terminal aumentam durante o acasalamento das fêmeas da salamandra *Taricha granulosa*.

A imunoreatividade do GnRH no EO dos teleósteos foi reportada no bagre *Clarias*

batrachus (Subhedar e Krishna, 1988) e na carpa *Cirrhinus mrigala* (Biju et al., 2003; Biju et al., 2005), onde os terminais nervosos dos neurônios do NT se localizaram na região rostral embaixo da lamina própria do EO e próximo das glândulas de Bowman envolvidas na produção de muco (Wirsig-Wiechmann e Oka, 2002). É conhecido que o NT é a fonte única do GnRH no epitélio olfatório (Yamamoto et al., 1995; Amano et al., 2002; Kawai et al., 2009). Estudos fisiológicos nas salamandras *Ambystoma mexicanum* e *Necturus maculosus* demonstraram que o GnRH modula a resposta do EO na detecção de aminoácidos e outras moléculas presentes no ambiente (Park e Eisthen, 2003; Zhang e Delay, 2007), pois o GnRH aumenta a sensibilidade das correntes de sódio por meio da fosforilação dos nucleotídeos cíclicos (cAMP/cGMP) dos NROs. Na carpa *C. mrigala*, a expressão de GnRH ocorre só nas larvas e nas fêmeas adultas, além de apresentar um pico de expressão na época de pré desova (Biju et al., 2003; Biju et al., 2005).

Embora não seja claro o mecanismo pelo qual o GnRH modula a resposta olfatória sobre os NROs do EO, existe a possibilidade que o GnRH regule a transdução do sinal olfatório (Kawai et al., 2009) ao modular a excitabilidade dos NROs aumentando sua resposta a moléculas odorantes (Eisthen et al., 2000; Kawai et al., 2009). A presença de receptores de GnRH no epitélio olfatório de salamandras e roedores indica que esta molécula tem efeitos diretos sobre as células do EO (Wirsig-Wiechmann e Jennes, 1993; Zhang e Delay, 2007). No entanto não se conhece especificamente que tipos celulares expressam cada subtipo de genes receptores do GnRH.

1.3 Hormônio inibidor de gonadotropina (GnIH)

O GnIH é um neuropeptídeo hipotalâmico (**Ser-Ile-Lys-Pro-Ser-Ala-Tyr-Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH₂**) originalmente identificado na codorna, que inibe a liberação e síntese das gonadotropinas na hipófise (Tsutsui et al., 2000). Após sua descoberta, outros peptídeos têm sido descritos como homólogos ao GnIH em vários grupos de animais, como em mamíferos (RFamide-related peptides, RFRPs) (Fukusumi et al., 2001), anfíbios (frog GH-releasing peptide, fGRP); Rana RFamide, R-RFa) (Sawada et al., 2002a), tritões (Chowdhury et al., 2011), e teleosteos (goldfish LPXRFamide, gLPXRFa) (Sawada et al., 2002b). Todos os precursores de GnIH identificados até agora codificam três ortólogos (LPXRFa-1, -2 e -3), no entanto para o goldfish apenas um foi purificado até o momento, o LPXRFa-3 (Shahjahan et al., 2014).

Análises utilizando imunomarcagem no cérebro do goldfish revelaram que o GnIH possui uma distribuição abundante em corpos celulares na região do nervo terminal e no hipotálamo

desde o qual estendem-se fibras até a hipófise. Também foram descritas fibras imunopositivas na região ventral do telencéfalo, lobo óptico e mesencéfalo (Sawada et al., 2002b).

Atualmente existe uma grande controvérsia a respeito do papel fisiológico do GnIH sobre a liberação de gonadotropinas. Em ratos (Murakami et al., 2008), hamsters (Kriegsfeld et al., 2006) e ovinos (Clarke et al., 2008), o GnIH/RFRP inibe a liberação de gonadotropinas. À ação inibitória do GnIH foi demonstrada em estudos onde a administração *in vivo* e *in vitro* do GnIH reduziu os níveis sanguíneos de Lh e Fsh (Ubuka et al., 2006). No entanto, existem vários trabalhos que demonstram que alguns homólogos do GnIH possuem uma função estimulatória, sendo os dois exemplos mais relevantes: 1) o GnIH das rãs estimula a liberação do hormônio de crescimento (Gh) (Koda et al., 2002) e a prolactina (Ukena et al., 2003). 2) O homólogo do GnIH no *goldfish* estimula a liberação de Gh e Lh no salmão (Amano et al., 2006). Estas diferenças podem estar relacionadas com a variação entre as sequências de aminoácidos descritas para cada espécie, e por esta razão que é necessário continuar estudando o papel do GnIH na reprodução em condições fisiológicas diferentes (Shahjahan et al., 2014).

A presença de fibras positivas de GnIH no hipotálamo sugere que este neuropeptídeo também atua diretamente no sistema nervoso central suprimindo o sistema reprodutivo (Parhar et al., 2012). Estudos morfológicos demonstram que as fibras positivas de GnIH apresentam uma disposição próxima aos corpos celulares dos neurônios GnRH1 na área preótica dos primatas, roedores, ovinos e aves, pelo qual entende-se que o GnIH atuaria diretamente nos neurônios GnRH1 inibindo funções reprodutivas (Ubuka et al., 2006). As fibras de GnIH também estão em contato com os corpos celulares de neurônios GnRH2 em mamíferos (Ubuka et al., 2009) e pássaros (Ubuka et al., 2008), pelo qual se sugere que o GnIH pode regular outros aspectos da reprodução como o comportamento.

Além disso, o GnIH também está envolvido na regulação da estimulação ou inibição do apetite. Os efeitos estimulantes têm sido observados em pássaros (Tachibana et al., 2005) e roedores (Johnson et al., 2007), no entanto, efeitos inibitórios são observados nas galinhas (Cline et al., 2008). As diferenças na função fisiológica do GnIH parecem ser resultado das variações espécie-específicas de sua sequência de seus aminoácidos. Sugere-se que este efeito do GnIH sobre o apetite pode estar relacionado com a presença de fibras GnIH em contato com neurônios liberadores de neuropeptídeo Y, orexina entre outros neurônios reconhecidos por estar envolvidos no controle do apetite (Qi et al., 2009).

1.4 Zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton)

O paulistinha, peixe-zebra ou zebrafish *Danio rerio* (Hamilton), é um dos mais importantes organismos modelo em genética, biologia do desenvolvimento, neurofisiologia entre outras disciplinas (Riva C. Marcus, 1999; Laan et al., 2002; Neuhauss, 2003; Abraham et al., 2009). Esta espécie apresenta uma série de características que o tornam particularmente adequado para experimentação. É um peixe pequeno, sendo possível manter um grande número de indivíduos em aquários no laboratório, possuem a capacidade de se reproduzir continuamente ao longo do ano. As fêmeas podem desovar a cada 2-3 dias e em uma única desova podem conter numerosos ovos que se desenvolvem e as larvas alcançam a maturidade gonadal num período curto de 3 a 4 meses (Spence et al., 2008). Os machos e as fêmeas são de coloração semelhante, embora os machos tendam a ter nadadeiras anais maiores e mais amarelas (Spence et al., 2008).

No zebrafish todas as gônadas inicialmente se desenvolvem como ovários, e os machos começam a diferenciar depois de cinco ou sete semanas após a eclosão (Maack e Segner, 2003). A ovulação é dependente da exposição das fêmeas aos feromônios gonadais masculinos. Estudos mostram que a água dos aquários de machos, homogeneizado de testículos e frações de testículos que continham os feromônios masculinos tinham a capacidade de induzir a ovulação, mas não conseguem fazê-lo em fêmeas anósmicas (fêmeas com o epitélio olfatório previamente cauterizado) (van den Hurk, 1987). Eaton e Farley (1974) mostraram que a exposição a um macho por 7 horas à tarde foi suficiente para permitir a extrusão manual dos ovos. A presença de um macho é essencial para as fêmeas gerarem ovos, pois fêmeas mantidas em isolamento apresentam processos necróticos nas gônadas que obstruem o oviduto impedindo qualquer desova. Bloom e Perlmutter (1977) mostraram que ambos os sexos produzem feromônios que funcionam como odorantes inter e intra-sexuais.

Interessantemente existem duas pesquisas que comprovaram que ao estimular o sistema olfatório do zebrafish, a acuidade visual aumenta, demonstrando uma clara relação entre o sistema olfatório e o sistema visual (Maaswinkel e Li, 2003; Stephenson et al., 2012). Sugere-se que esta relação é mediada pelo nervo terminal, pois este recebe informação tanto da retina quanto do epitélio olfatório. É precisamente no nervo terminal que se expressa o GnRH2 ou o GnRH3, dependendo da espécie. Tem sido estudado que o GnRH presente no nervo terminal desempenha um papel importante na regulação do comportamento sexual dos peixes. É importante destacar que já foi descrito que o GnRH modula a acuidade tanto visual quanto olfatória. Existem estudos que reportam a presença de receptores de GnRH em diferentes camadas da retina, no entanto ainda não é clara a presença de receptores no epitélio olfatório. Por

tanto o objetivo do presente estudo foi analisar a localização e as possíveis variações na expressão do GnRH2, GnRH3 seus receptores (GnRH-R1,2,3 e 4) e do GnIH (hormônio inibidor de gonadotropinas) no sistema olfato-retinal e as gônadas de fêmeas em diferentes estágios de maturação gonadal. Sendo os objetivos específicos:

- Caracterizar a expressão do *gnrh2*, *gnrh3* e seus receptores (*gnrhr1,2,3* e *4*) no epitélio olfatório, retina, bulbo olfatório e gônadas de machos e fêmeas adultos de *D. rerio*;
- Analisar por hibridização *in situ* a localização dos receptores (*gnrhr1,2,3* e *4*) no epitélio olfatório, retina e gônadas de machos e fêmeas adultos de *D. rerio*.
- Avaliar por imunohistoquímica a localização do GnRH3 no epitélio olfatório, retina e gônadas de machos e fêmeas adultos;
- Comparar a expressão do *gnrh2*, *gnrh3* e seus receptores (*gnrhr1,2,3* e *4*) no epitélio olfatório, retina, bulbo olfatório e gônadas de fêmeas em diferentes estágios de maturação gonadal.

2 Referências

- Abe, H., Oka, Y., 2007. Neuromodulatory functions of terminal nerve-GnRH neurons. *Fish Physiology* 25, 455-503.
- Abraham, E., Palevitch, O., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2009. The zebrafish as a model system for forebrain GnRH neuronal development. *General and Comparative Endocrinology* 164, 151-160.
- Amano, M., Moriyama, S., Iigo, M., Kitamura, S., Amiya, N., Yamamori, K., Ukena, K., Tsutsui, K., 2006. Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon. *Journal of Endocrinology* 188, 417-423.
- Amano, M., Oka, Y., Yamanome, T., Okuzawa, K., Yamamori, K., 2002. Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri*. *Cell and Tissue Research* 309, 323-329.
- Andreu-Vieyra, C.V., Habibi, H.R., 2001. Effects of salmon GnRH and chicken GnRH-II on testicular apoptosis in goldfish *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 129, 483-487.
- Biju, K.C., Gaikwad, A., Sarkar, S., Schreibman, M.P., Subhedar, N., 2005. Ontogeny of GnRH-like immunoreactive neuronal systems in the forebrain of the Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *General and Comparative Endocrinology* 141, 161-171.
- Biju, K.C., Singru, P.S., Schreibman, M.P., Subhedar, N., 2003. Reproduction phase-related expression of GnRH-like immunoreactivity in the olfactory to the olfactory bulb and in the receptor neurons, their projections nervus terminalis in the female Indian major carp *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *General and Comparative Endocrinology* 133, 358-367.
- Bloom, H.D., Perlmuter, A., 1977. Sexual aggregating pheromone system in zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton - Buchanan). *Journal of Experimental Zoology* 199, 215-226.
- Clarke, I.J., Sari, I.P., Qi, Y., Smith, J.T., Parkington, H.C., Ubuka, T., Iqbal, J., Li, Q., Tilbrook, A., Morgan, K., Pawson, A.J., Tsutsui, K., Millar, R.P., Bentley, G.E., 2008. Potent Action of RFamide-Related Peptide-3 on Pituitary Gonadotropes Indicative of a Hypophysiotropic Role in the Negative Regulation of Gonadotropin Secretion. *Endocrinology* 149, 5811-5821.

- Cline, M.A., Bowden, C.N., Calchary, W.A., Layne, J.E., 2008. Short-term anorexigenic effects of central neuropeptide VF are associated with hypothalamic changes in chicks. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 971-977.
- Cross, E., Roselli, C.E., 1999. 17 beta-estradiol rapidly facilitates chemoinvestigation and mounting in castrated male rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 276, R1346-R1350.
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W., Clarke, S., 2006. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 256, 489-501.
- Chen, C.C., Fernald, R.D., 2008. GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *Journal of Fish Biology* 73, 1099-1120.
- Chiba, A., 2005. Neuropeptide Y-immunoreactive (NPY-ir) structures in the brain of the gar *Lepisosteus oculatus* (Lepisosteiformes, Osteichthyes) with special regard to their anatomical relations to gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-ir structures in the hypothalamus and the terminal nerve. *General and Comparative Endocrinology* 142, 336-346.
- Chowdhury, V.S., Ubuka, T., Osugi, T., Shimura, T., Tsutsui, K., 2011. Identification, localization and expression of LPXRFamide peptides, and melatonin-dependent induction of their precursor mRNA in the newt brain. *Journal of Endocrinology* 209, 211-220.
- Donatti, L., Fanta, E., 2007. Retinomotor movements in the Antarctic fish *Trematomus newnesi* Boulenger submitted to different environmental light conditions. *Revista Brasileira de Zoologia* 24, 457-462.
- Eaton, R.C., Farley, R.D., 1974. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. *Copeia* 1974, 195-209.
- Eisthen, H.L., Delay, R.J., Wirsig-Wiechmann, C.R., Dionne, V.E., 2000. Neuromodulatory effects of gonadotropin releasing hormone on olfactory receptor neurons. *Journal of Neuroscience* 20, 3947-3955.
- Fernald, R., 2000. Sensory Systems, in: G, O. (Ed.), *The Laboratory Fish Handbook of experimental animals*. Elsevier, pp. 225-233.
- Flanagan, C.A., Chen, C. C., Coetsee, M., Mamputha, S., Whitlock, K. E., Bredekamp, N., Grosenick, L., Fernald, R. D. & Illing, N., 2007. Expression, structure, function, and evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors GnRH-R1SHS and GnRH-R2PEY in the teleost, *Astatotilapia burtoni*. *Endocrinology* 148, 5060-5071.
- Fritsch, G., 1878. Untersuchungen über den feineren Bau des Fischgehirns mit besonderer Berücksichtigung der Homologien bei anderen Wirbelthierklassen: Mit Unterstützung der Kgl. Akad. der Wissensch.zu Berlin herausgeg. ; Mit 13 lithographirten Tafeln und 16 in den Text gedruckten Holzschnitten. Gutmann.
- Fukusumi, S., Habata, Y., Yoshida, H., Iijima, N., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Kitada, C., Shintani, Y., Suenaga, M., Onda, H., Nishimura, O., Tanaka, M., Ibata, Y., Fujino, M., 2001. Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1540, 221-232.
- Gabor, C.R., Grober, M.S., 2010. A potential role of male and female androgen in species recognition in a unisexual-bisexual mating complex. *Hormones and Behavior* 57, 427-433.
- González-Martínez, D., Sarasquete, C., Pascual, E., Muñoz-Cueto, J.A., 2006. Expression of gonadotrophin-releasing hormone binding sites in somatic tissues of the gilthead seabream (*Sparus aurata*): a quantitative autoradiographic study. *Histol Histopathol* 21, 1065-1073.
- Hamdani, E.H., Doving, K.B., 2002. The alarm reaction in crucian carp is mediated by olfactory neurons with long dendrites. *Chemical Senses* 27, 395-398.
- Hamdani, E.H., Doving, K.B., 2007. The functional organization of the fish olfactory system. *Progress in Neurobiology* 82, 80-86.

- Hansen, A., Rolen, S.H., Anderson, K., Morita, Y., Caprio, J., Finger, T.E., 2003. Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish. *Journal of Neuroscience* 23, 9328-9339.
- Hansen, A., Zippel, H.P., Sorensen, P.W., Caprio, J., 1999. Ultrastructure of the olfactory epithelium in intact, axotomized, and bulbectomized goldfish, *Carassius auratus*. *Microscopy Research and Technique* 45, 325-338.
- Hara, T., 2000. Chemoreception, in: K, O.G. (Ed.), *The Laboratory Fish*. Elsevier, Great Britain.
- Hara, T.J., 1994. The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 1-35.
- Hara, T.J., Zielinski, B., 2007. *Fish Physiology: Sensory Systems Neuroscience*. Academic Press, San Diego, California.
- Johnson, M.A., Tsutsui, K., Fraley, G.S., 2007. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Hormones and Behavior* 51, 171-180.
- Kawai, T., Oka, Y., Eisthen, H., 2009. The Role of the Terminal Nerve and GnRH in Olfactory System Neuromodulation. *Zoological Science* 26, 669-680.
- Koda, A., Ukena, K., Teranishi, H., Ohta, S., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Tsutsui, K., 2002. A novel amphibian hypothalamic neuropeptide: Isolation, localization, and biological activity. *Endocrinology* 143, 411-419.
- Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., Silver, R., 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2410-2415.
- Laan, M., Richmond, H., He, C.M., Campbell, R.K., 2002. Zebrafish as a model for vertebrate reproduction: Characterization of the first functional zebrafish (*Danio rerio*) gonadotropin receptor. *General and Comparative Endocrinology* 125, 349-364.
- Laberger, F., Hara, T.J., 2001. Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Research Reviews* 36, 46-59.
- Lastein, S., Hamdani, E.H., Doving, K.B., 2006. Gender distinction in neural discrimination of sex pheromones in the olfactory bulb of crucian carp, *Carassius carassius*. *Chemical Senses* 31, 69-77.
- Lethimonier, C., Madigou, T., Munoz-Cueto, J.A., Lareyre, J.J., Kah, O., 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 135, 1-16.
- Levavi-Sivan, B., Avitan, A., 2005. Sequence analysis, endocrine regulation, and signal transduction of GnRH receptors in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 142, 67-73.
- Lim, H., Sorensen, P.W., 2011. Polar Metabolites Synergize the Activity of Prostaglandin F-2 alpha in a Species-Specific Hormonal Sex Pheromone Released by Ovulated Common Carp. *Journal of Chemical Ecology* 37, 695-704.
- Maack, G., Segner, H., 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology* 62, 895-906.
- Maaswinkel, H., Li, L., 2003. Olfactory input increases visual sensitivity in zebrafish: a possible function for the terminal nerve and dopaminergic interplexiform cells. *Journal of Experimental Biology* 206, 2201-2209.
- Millar, R.P., 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science* 88, 5-28.
- Millar, R.P., Lu, Z.L., Pawson, A.J., Flanagan, C.A., Morgan, K., Maudsley, S.R., 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Reviews* 25, 235-275.
- Millar, R.P., Newton, C.L., 2013. Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nature Reviews Endocrinology* 9, 451-466.

- Murakami, M., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Yasui, T., Irahara, M., Osugi, T., Tsutsui, K., 2008. Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *Journal of Endocrinology* 199, 105-112.
- Muske, L.E., 1993. Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brain Behavior and Evolution* 42, 215-230.
- Neuhauss, S.C.F., 2003. Behavioral genetic approaches to visual system development and function in zebrafish. *Journal of Neurobiology* 54, 148-160.
- Onuma, T., Ando, H., Koide, N., Okada, H., Urano, A., 2005. Effects of salmon GnRH and sex steroid hormones on expression of genes encoding growth hormone/prolactin/somatolactin family hormones and a pituitary-specific transcription factor in masu salmon pituitary cells in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 143, 129-141.
- Parhar, I., Ogawa, S., Kitahashi, T., 2012. RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Progress in Neurobiology* 98, 176-196.
- Parhar, I.S., Iwata, M., 1994. Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH) neurons project to growth-hormone and somatolactin cells in the steelhead trout. *Histochemistry* 102, 195-203.
- Park, D., Eisthen, H.L., 2003. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) modulates odorant responses in the peripheral olfactory system of axolotls. *Journal of Neurophysiology* 90, 731-738.
- Pati, D., Habibi, H.R., 2002. Involvement of Protein Kinase C and Arachidonic Acid Pathways in the Gonadotropin-Releasing Hormone Regulation of Oocyte Meiosis and Follicular Steroidogenesis in the Goldfish Ovary. *Biology of Reproduction* 66, 813-822.
- Propper, C.R., Moore, F.L., 1991. Effects of courtship on brain gonadotropin hormone-releasing hormone and plasma steroid concentrations in a female amphibian (*Taricha granulosa*). *General and Comparative Endocrinology* 81, 304-312.
- Qi, Y., Oldfield, B.J., Clarke, I.J., 2009. Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *Journal of Neuroendocrinology* 21, 690-697.
- Riva C. Marcus, C.L.D., Stephen S. Easter Jr., 1999. Neurogenesis in the visual system of embryonic and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Visual Neuroscience* 16.
- Sato, K., Suzuki, N., 2001. Whole-cell response characteristics of ciliated and microvillous olfactory receptor neurons to amino acids, pheromone candidates and urine in rainbow trout. *Chemical Senses* 26, 1145-1156.
- Sawada, K., Ukena, K., Kikuyama, S., Tsutsui, K., 2002a. Identification of a cDNA encoding a novel amphibian growth hormone-releasing peptide and localization of its transcript. *Journal of Endocrinology* 174, 395-402.
- Sawada, K., Ukena, K., Satake, H., Iwakoshi, E., Minakata, H., Tsutsui, K., 2002b. Novel fish hypothalamic neuropeptide - Cloning of a cDNA encoding the precursor polypeptide and identification and localization of the mature peptide. *European Journal of Biochemistry* 269, 6000-6008.
- Schowb, J.E., 2002. Neural Regeneration and the Peripheral Olfactory. *The Anatomical Record* 269, 33-49.
- Schwanzel-Fukuda, M., Pfaff, D.W., 1990. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. *Experientia* 46, 956-962.
- Servili, A., Herrera-Perez, P., Kah, O., Antonio Munoz-Cueto, J., 2012. The retina is a target for GnRH-3 system in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *General and Comparative Endocrinology* 175, 398-406.
- Shahjahan, M., Kitahashi, T., Parhar, I.S., 2014. Central Pathways Integrating Metabolism and Reproduction in Teleosts. *Frontiers in Endocrinology* 5, 1-17.

- Sherwood, N.M., Schalburg, K.V., Lescheid, D., 1997. Origin and evolution of GnRH in vertebrates and invertebrates, in: Parhar, I.S., Y, S. (Eds.), GnRH Neurons: Gene to Behavior. Brain Shuppan, pp. 3-25.
- Sorensen, P.W., Hara, T.J., Stacey, N.E., 1991. Sex pheromones selectively stimulate the medial olfactory tracts of male goldfish. *Brain Research* 558, 343-347.
- Specca, D.J., Lin, D.M., Sorensen, P.W., Isacoff, E.Y., Ngai, J., Dittman, A.H., 1999. Functional identification of a goldfish odorant receptor. *Neuron* 23, 487-498.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83, 13-34.
- Stephenson, J.F., Partridge, J.C., Whitlock, K.E., 2012. Food and Conspecific Chemical Cues Modify Visual Behavior of Zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* 9, 68-73.
- Subhedar, N., Krishna, N.S.R., 1988. Immunocytochemical localization of LH-RH in the brain and pituitary of the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *General and Comparative Endocrinology* 72, 431-442.
- Tachibana, T., Sato, M., Takahashi, H., Ukena, K., Tsutsui, K., Furuse, M., 2005. Gonadotropin-inhibiting hormone stimulates feeding behavior in chicks. *Brain Research* 1050, 94-100.
- Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., Sharp, J.P., 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275, 661-667.
- Ubuka, T., Kim, S., Huang, Y.C., Reid, J., Jiang, J., Osugi, T., Chowdhury, V.S., Tsutsui, K., Bentley, G.E., 2008. Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain. *Endocrinology* 149, 268-278.
- Ubuka, T., Morgan, K., Pawson, A.J., Osugi, T., Chowdhury, V.S., Minakata, H., Tsutsui, K., Millar, R.P., Bentley, G.E., 2009. Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *Plos One* 4, e80400.
- Ubuka, T., Ukena, K., Sharp, P.J., Bentley, G.E., Tsutsui, K., 2006. Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology* 147, 1187-1194.
- Ukena, K., Koda, A., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Iwakoshi-Ukena, E., Minakata, H., Kikuyama, S., Tsutsui, K., 2003. Novel neuropeptides related to frog growth hormone-releasing peptide: Isolation, sequence, and functional analysis. *Endocrinology* 144, 3879-3884.
- Umino, O., Dowling, J.E., 1991. Dopamine release from interplexiform cells in the retina: effects of GnRH, FMRFamide, bicuculline, and enkephalin on horizontal cell activity. *Journal of Neuroscience* 11, 3034-3046.
- van den Hurk, R., Schoonen, W. G. E. J., van Zoelen, G. A., Lambert, J. G. D, 1987. The biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *General and Comparative Endocrinology* 68, 179-188.
- White, R.B., Fernald, R.D., 1998. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species. *General and Comparative Endocrinology* 112, 17-25.
- Wirsig-Wiechmann, C.R., Jennes, L., 1993. Gonadotropin-Releasing-Hormone agonist binding in tiger salamander nasal cavity. *Neuroscience Letters* 160, 201-204.
- Wirsig-Wiechmann, C.R., Oka, Y., 2002. The terminal nerve ganglion cells project to the olfactory mucosa in the dwarf gourami. *Neuroscience Research* 44, 337-341.
- Yamamoto, N., Ito, H., 2000. Afferent sources to the ganglion of the terminal nerve in teleosts. *Journal of Comparative Neurology* 428, 355-375.
- Yamamoto, N., Oka, Y., Amano, M., Aida, K., Hasegawa, Y., Kawashima, S., 1995. Multiple Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH)-immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami,

Colisalia - immunohistochemistry and radioimmunoassay. *Journal of Comparative Neurology* 355, 354-368.

Yamamoto, N., Oka, Y., Kawashima, S., 1997. Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: Effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. *Neuroendocrinology* 65, 403-412.

Yamamoto, Y., Ueda, H., 2009. Behavioral responses by migratory chum salmon to amino acids in natal stream water.

Yambe, H., Kitamura, S., Kamio, M., Yamada, M., Matsunaga, S., Fusetani, N., Yamazaki, F., 2006. L-Kynurenine, an amino acid identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15370-15374.

Zhang, W., Delay, R.J., 2007. Gonadotropin-releasing hormone modulates voltage-activated sodium current and odor responses in *Necturus maculosus* olfactory sensory neurons. *Journal of Neuroscience Research* 85, 1656-1667.

CAPÍTULO II

GnRH/GnIH e seus receptores no sistema olfato-retinal ao longo dos estágios de maturação ovariana em zebrafish

Revista: General and Comparative Endocrinology (ISSN: 0016-6480)

Qualis Capes A1 (Zootecnia/Recursos Pesqueiros); Fator de impacto: 2.674

Resumo

O hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) é um dos fatores chaves na regulação neuroendócrina da reprodução dos vertebrados. Alguns peixes apresentam três variantes do GnRH: o GnRH1 envolvido na secreção de gonadotropinas, o GnRH2 que regula o comportamento alimentar e sexual e o GnRH3 expresso no bulbo olfatório e o nervo terminal cujas fibras nervosas inervam a retina e o epitélio olfatório. No sistema olfatório o GnRH regula a sensibilidade na detecção de alimento, o reconhecimento intra e interespecífico, entre outros. Na retina, o GnRH3 pode estar envolvido na acuidade visual e do processamento de informação da retina. No presente estudo analisamos a localização do GnRH2, GnRH3 e seus receptores (GnRH-R1,2,3 e 4) e do GnIH (hormônio inibidor de gonadotropinas) no epitélio olfatório, a retina, o bulbo olfatório e as gônadas de fêmeas em diferentes estágios de maturação gonadal. Para tanto, o RNA dos diferentes tecidos foi extraído e com base na sequência dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3* e *gnrhr4*, primers foram desenhados para RT-PCR e qPCR. Sondas para a hibridização *in situ* foram construídas para verificar os sítios de expressão destas moléculas nos diferentes órgãos. Imunohistoquímica com os anticorpos anti-GnRH3 (BB8 e GF6) foi realizada para localizar a proteína do GnRH3. Os resultados mostram que no epitélio olfatório há um aumento na expressão dos receptores de GnRH nos estágios finais de maturação ovariana. O epitélio olfatório apresenta GnRH3 no citoplasma dos neurônios receptores olfatórios, assim como nos cílios destas células e também nas fibras do nervo olfatório. No bulbo olfatório, encontramos uma relação inversa entre a expressão de *gnih* e *gnrh3* em todos os estágios de maturação gonadal. Na retina, os sítios de expressão do receptor *gnrhr4* ocorrem nos núcleos das células amácrinas, bipolares e ganglionares, onde também foram observadas fibras positivas ao GnRH3. Nas gônadas femininas, o GnRH3 e seus receptores (*gnrhr2* e *gnrhr4*) ocorrem em oócitos perinucleolares, enquanto que o *gnih* em oócitos em estágio de alvéolo cortical. Nas gônadas masculinas, o GnRH3 e seus receptores (*gnrhr1* e *gnrhr4*) ocorrem em células

germinativas e células intersticiais. O presente trabalho, de forma inédita, apresenta as variações na expressão gênica do sistema *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, e dos receptores (*gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3*, *gnrhr4*) no sistema olfato-retinal assim como nos ovários, sugerindo que o sistema GnRH/GnIH esta envolvido na neuromodulação dos sistemas sensoriais especialmente nos estágios finais da maturação assim como a possível regulação dos processos de esteroidogênese e gametogênese nas gônadas do zebrafish.

Palavras chave: sistemas sensoriais, GnRH, GnIH, nervo terminal.

1. Introdução

Nos vertebrados, o crescimento e a reprodução são regulados pelo eixo hipotalâmico-hipofisario-gonadal, no qual o hormônio liberador de gonadotropina GnRH é considerado um dos elementos centrais no processo. Isso se deve ao fato do GnRH estimular a síntese e liberação das gonadotropinas, Fsh (hormônio folículo estimulante) e Lh (hormônio luteinizante), que controlam a gametogênese e a esteroidogênese gonadal (Chen e Fernald, 2008) via seus receptores (GnRH-R), os quais pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteínas G, que apresentam sete domínios transmembranais de hélices alfa hidrofóbicas ligadas por loops hidrofílicos extra e intracelulares (Chen e Fernald, 2008). Os GnRH-R apresentam um domínio extracelular N-terminal e um domínio citoplasmático C-terminal. Sugere-se que os loops intracelulares e o domínio C-terminal regulam diversas funções como a transdução dos sinais, a ligação de proteínas G, entre outras (Levavi-Sivan e Avitan, 2005; Millar, 2005).

Desde sua descoberta em suínos (Baba et al., 1971) e ovinos (Amoss et al., 1971), 15 diferentes formas de GnRH já foram identificadas em vertebrados (Shahjahan et al., 2014). Atualmente, o GnRH é classificado em três tipos de acordo com a sua localização e função: tipo 1 (GnRH1), tipo 2 (GnRH2) e tipo 3 (GnRH3), sendo a última forma exclusiva de alguns teleosteos (White e Fernald, 1998). Em algumas espécies, como alguns salmonídeos e o zebrafish, duas formas de GnRH (GnRH3 e GnRH2) são encontradas, sendo a forma 3 expressa na região ventral do prosencéfalo, e a forma 2 entre o diencéfalo e mesencéfalo (Parhar e Iwata, 1994; Abraham et al., 2009). Em termos funcionais, o GnRH2 parece estar envolvido na regulação do comportamento sexual, alimentar (Sherwood et al., 1997) e no caso de algumas espécies apresenta também funções hipofisiotróficas junto ao GnRH3 (Lethimonier et al., 2004), enquanto que o GnRH3 está relacionado com a regulação dos mecanismos neurais do comportamento sexual (Eisthen et al., 2000; Biju et al., 2003; Biju et al., 2005) como a construção de ninho de bolhas pelo macho de *Colisa lalia* (Yamamoto et al., 1997), e a migração e desova do salmão (Onuma et al., 2005), entre outros.

Vários estudos em teleósteos destacam a importância da presença do GnRH (possivelmente GnRH3) na regulação da acuidade visual (Maaswinkel e Li, 2003) e a sensibilidade do epitélio olfatório (Kawai et al., 2009) através do nervo terminal (NT). Nos vertebrados os neurônios do NT inervam a região telencefálica dorsal e ventral, o hipotálamo, o cérebro médio, o torus semicircularis, o tectum óptico, o bulbo olfatório (BO), a medula, o epitélio olfatório (EO) e a retina (Abe e Oka, 2007). Desta forma, o NT é responsável por receber e integrar sinais visuais, olfatórios e somatosensoriais (Yamamoto e Ito, 2000).

Estudos sugerem que o GnRH3 modula a atividade do sistema olfatório na detecção de alimento, acasalamento e no reconhecimento inter e intraespecífico (Kawai et al., 2009). Embora não seja claro o mecanismo pelo qual o GnRH modula a resposta olfatória, existe a possibilidade que o GnRH regule a transdução do sinal olfatório (Kawai et al., 2009) ao modular a excitabilidade dos neurônios do receptor olfatório (NROs), aumentando desta forma sua resposta a moléculas odorantes (Eisthen et al., 2000; Kawai et al., 2009). A presença de receptores de GnRH no epitélio olfatório (EO) de salamandras e roedores indica que esta molécula possa ter efeitos no sistema olfatório (Wirsig-Wiechmann e Jennes, 1993; Zhang e Delay, 2007). Em peixes, a presença de GnRH, assim como de seus receptores no EO ainda é desconhecido para várias espécies.

O GnIH é um neuropeptídeo hipotalâmico originalmente identificado na codorna, que regula a liberação e síntese das gonadotropinas na hipófise (Tsutsui et al., 2000). Atualmente existe uma ampla controvérsia a respeito do papel fisiológico do GnIH sobre a liberação de gonadotropinas. Reporta-se que em ratos (Murakami et al., 2008), hamsters (Kriegsfeld et al., 2006) e ovinos (Clarke et al., 2008) o GnIH inibe a liberação de gonadotropinas. No entanto, existem vários estudos que demonstram que alguns homólogos do GnIH possuem uma função estimuladora, sendo os dois exemplos mais relevantes: 1) o GnIH das rãs estimula a liberação do hormônio de crescimento (GH) (Koda et al., 2002) e a prolactina (Ukena et al., 2003). 2) O homólogo do GnIH do goldfish estimula a liberação de GH e LH no salmão (Amano et al., 2006), assim como o LPXRFa (goldfish LPXRFamide) estimula a liberação de gonadotropinas na tilápia (Biran et al., 2014)

A presença de fibras de GnIH no hipotálamo sugere que este neuropeptídeo atue diretamente no sistema nervoso central suprimindo o sistema reprodutivo (Parhar et al., 2012). Isto se deve ao fato de que fibras do GnIH apresentam uma disposição próxima aos corpos celulares dos neurônios GnRH1 na área preótica de primatas, roedores, ovinos e aves. Desta forma, sugere-se que o GnIH atuaria diretamente nos neurônios GnRH1 inibindo funções reprodutivas (Ubuka et al., 2006). As fibras de GnIH também estão em contato com os corpos

celulares de neurônios GnRH2 em mamíferos (Ubuka et al., 2009) e pássaros (Ubuka et al., 2008), indicando que o GnRH possa regular outros aspectos da reprodução como o comportamento.

Conforme já mencionado, os sistemas sensoriais são centros de integração de informações fundamentais em diversos processos ao longo da vida dos seres vivos. Ao longo da última década, o zebrafish tornou-se um dos peixes ornamentais mais utilizados como modelo experimental dentre os vertebrados. Neste contexto e utilizando o zebrafish como modelo experimental, estudos recentes demonstram uma clara relação entre o sistema olfatório e o sistema visual, uma vez que ao estimular o sistema olfatório do zebrafish, a acuidade visual melhora e aumenta neste modelo (Maaswinkel e Li, 2003; Stephenson et al., 2012). Por receber informação tanto da retina quanto do EO, sugere-se que esta relação seja mediada pelo nervo terminal. Além disso, é no nervo terminal que se expressa o GnRH2 ou o GnRH3, dependendo da espécie. Sabendo que GnRH presente no nervo terminal desempenha um papel importante na regulação do comportamento sexual dos peixes e que existem receptores de GnRH em diferentes camadas da retina, é possível que o sistema GnRH esteja envolvido na integração entre os sistemas olfatório e visual, sendo um importante modulador dos estímulos sensoriais. Além disso, é possível que exista uma correlação destas moléculas e seus receptores no eixo EO-Bulbo-Retina com os processos reprodutivos. Por tanto, o presente estudo pretende analisar a localização dos receptores (*gnrh-r1,2,3 e 4*), o *gnih* e o GnRH3 no epitélio olfatório, retina e bulbo olfatório de *D. rerio*, além de comparar a expressão do *gnrh2*, *gnrh3*, seus receptores (*gnrh-r1,2,3 e 4*) e o *gnih* no epitélio olfatório, a retina e o bulbo olfatório de fêmeas em diferentes estágios de maturação gonadal.

2. Material e métodos

2.1 Animais e Amostras

O experimento foi realizado utilizando-se 70 exemplares adultos de *D. rerio*, mantidos nas dependências do Laboratório do Grupo de Biologia Molecular e Reprodutiva IB/UNESP, Botucatu-SP. Os peixes foram anestesiados em solução de 100 mg/L de benzocaína (1%) e posteriormente eutanasiados. Os órgãos coletados (epitélio olfatório, retina, encéfalo, bulbo olfatório e gônadas) foram posteriormente armazenados a -80°C até serem utilizados para a extração de RNA. O projeto experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, sob o protocolo de número 2554/15.

Para conferir o estágio de maturação gonadal, uma das gônadas coletadas foi fixada em Karnovsky modificado – solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas e desidratada com concentrações crescentes de etanol. Posteriormente, as amostras permaneceram por quatro horas na solução de pré-infiltração de glicolmetacrilato (GMA) com etanol (1:1), por 16 horas em GMA (etapa de infiltração) e finalmente foram incluídas em histomoldes. Os cortes foram obtidos com 2µm de espessura, montados em lâminas e corados com Azul de Toluidina. Os ovários foram classificados em quatro estágios de maturação: crescimento primário (CP), pré-vitelogênese (PV), vitelogênese intermediária (VM) e vitelogênese tardia (VT), de acordo com Wang e Ge (2004).

2.2 Extração de RNA total e transcrição reversa

Para a realização das análises de expressão gênica, foi necessária a extração de RNA total de epitélios e bulbos olfatórios que foi realizada com pools de três amostras com duas réplicas utilizando o kit PureLink® RNA Mini Kit (Ambion®), de acordo com as especificações do fornecedor. Para os órgãos de maior tamanho (retina e gônadas) foram utilizados um n=4 amostras por tecidos e estágios gonadais para a extração do RNA total utilizando a técnica de Trizol™ (Invitrogen, USA). Para estes tecidos foi feito tratamento de DNase usando o *DNase I*, RNase-free kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para remover qualquer impureza de DNA genômico. O RNA extraído foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) utilizando hexâmeros randomicos de acordo com especificações do fabricante e padronizados por Nóbrega e colaboradores (2010).

2.3 Amplificação dos genes por RT-PCR (reação da transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase)

Para avaliar a expressão dos genes de forma semi-quantitativa ou qualitativa foram realizadas reações de PCR com os cDNAs sintetizados através da transcrição reversa (citado anteriormente), num total de 25µl sendo submetidos a 40 ciclos (20s a 94°C, 35s a 58°C e 120s a 72°C). O produto da PCR foi separado em gel de agarose 1% e documentado em sistema fotoiluminador.

Os primers para os genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, *gnrh-r1*, *gnrh-r2*, *gnrh-r3* e *gnrh-r4* foram desenhados e sintetizados com base em sequências previamente publicadas no NCBI (Tabela 1). Também foram desenhados e sintetizados um conjunto de *primers* para a sequência do gene β -

actina a partir de uma sequência publicada no NCBI para zebrafish, utilizado como gene de referência (controle positivo) para os RT-PCR (Tabela 1).

Tabela 1. Especificações dos primer utilizados na RT-PCR.

Gene	Tamanho (pb)	Sequência (5'-3')	Orientação	Sequência de referência NCBI
<i>gnrh2</i>	107	TCAGGATTACCAACACCGGG	Forward	NM_181439.4
		CAGACCAGCACCATCACTTCA	Reverse	
<i>gnrh3</i>	146	CAACATTCAAGGATGTTGGATCC	Forward	NM_182887.2
		CCGTCTGTCTGGAAATCTTTG	Reverse	
<i>gnih</i>	133	GAGTTCTCCAACCATCCTAC	Forward	NM_001082949.1
		GTTGATGGTAGACTTGGGAG	Reverse	
<i>gnrhr1</i>	130	CGCCTCTCCACAGTTATTTATTT	Forward	NM_001144980.1
		GGTGACAAAGTGGAACATGT	Reverse	
<i>gnrhr2</i>	114	GTGGACCATGAGTGTCGTGT	Forward	NM_001144979.1
		CGAGAGCTAAAGCTGCCGTA	Reverse	
<i>gnrhr3</i>	115	ACGGTGAAAGCGAAGAGTGT	Forward	NM_001177450.1
		GGATCACGTACAGCGTCACA	Reverse	
<i>gnrh4</i>	119	CCAAAGGAAACATCTCTTCA	Forward	NM_001098193.1
		GCAAACATAAAAGGAGGTCA	Reverse	
<i>βactina</i>	340	TGACCTGACAGACTACCTGA	Forward	AF057040.1
		GTTGGCATA CAGGTCCTTAC	Reverse	

2.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para às análises de expressão gênica por qPCR, foram feitas duplicatas de amostras de epitélio e bulbo olfatório, retina e gônadas. As reações foram realizadas com SYBR Green kit (Invitrogen), para os fragmentos amplificados de cDNA dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, *gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3* e *gnrhr4* e utilizado os primers da Tabela 2. As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, usando uma concentração final de 900 nM para cada um dos primers, com 300 ng de RNA total inicial. Os níveis de mRNA (Cts) foram normalizados pelos genes de referência *β -actina* e o *efl α* (fator de alongação 1 alfa) e posteriormente calibrados com a média dos Cts do calibrador (sendo determinado pela menor ou maior expressão) (ddCt). Os Cts foram determinados através do 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em reações de 20 μ l, utilizando como master mix Syber Green, analisados com o IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1 Software (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

Tabela 2. Especificações dos primer utilizados na qPCR.

Gene	Tamanho (pb)	Sequência (5'-3')	Orientação	Sequência de referência NCBI
<i>gnrh2</i>	102	TCAGGATTACCAACACCGGG	Forward	NM_181439.4
		CAGACCAGCACCATCACTTCA	Reverse	
<i>gnrh3</i>	100	AACACAGCAGTTTTAGCATGGAG	Forward	NM_182887.2
		TATGACCA GTGCTGGCAAAGA	Reverse	
<i>gnih</i>	100	AAGAAAGGACTCAAGTCCACGA	Forward	NM_001082949.1
		GGGCTTTGTTAGTCTAAAGCTGTG	Reverse	
<i>gnrhr1</i>	100	CCTGTATGTGTTCCCTCTCCTG	Forward	NM_001144980.1
		CTCTCCACCCTTGCCCTTAC	Reverse	
<i>gnrhr2</i>	100	CATACCGCAGGTATTTGTTTTCCA	Forward	NM_001144979.1
		CTCTTGCCAGCGAGAGCTAA	Reverse	
<i>gnrhr3</i>	100	AAGAGTGTGGACTTACGCA	Forward	NM_001177450.1
		TCACGTACAGCGTCAAAAGT	Reverse	
<i>gnrh4</i>	100	CCGTTCCCTCAGATGTTCCCTGT	Forward	NM_001098193.1
		TCCTGCCAGTGTGACGAA	Reverse	
<i>βactina</i>	100	TGCTCTGTATGGCGCATTGA	Forward	NM_131031.1
		GCTCCTCCCCCTGTTAGACAAC	Reverse	
<i>efl α</i>	100	GCCGTCCCACCGACAAG	Forward	FJ915061.1
		CCACACGACCCACAGGTACAG	Reverse	

2.5 Hibridização *in situ*

Para identificar os sítios de expressão dos receptores *gnrhr* 1, 2, 3, 4 e o *gnih* no epitélio olfatório, retina e gônadas, sondas de RNA foram construídas e utilizadas em técnicas de hibridização *in situ*. Para a construção das sondas, foram adicionadas sequências promotoras T3 e T7 (promotores da RNA polimerase) nos primers forward e reverse (Tabela 3), respectivamente. O produto esperado da PCR (*gnrhr3* com 100 pares de base e os outros produtos com cerca de 400 pb) foi extraído, purificado com Zymoclean DNA recovery kit (Sinapse D4001) e submetido à transcrição utilizando-se DIG-UTP (digoxigenina) e RNA polimerase T7 (anti-senso) e T3 (senso) do Kit Roche (11758888001 Roche), conforme especificações do fabricante. As hibridizações *in situ* foram realizadas com adaptações do protocolo de Thisse e colaboradores (2008).

Tabela 3. Especificações das sondas utilizadas, destacando as regiões promotoras das sondas T7 (vermelho) e T3 (azul).

Gene	Sequência (5'-3')	Orientação
<i>gnih</i>	GGGCGGGTGT TTATTAACCCTCACTAAA GAGACCGAGCTCCCAAGTCTA	Forward
	CCGGGGGGTGT TAATACGACTCACTATA GTCGACCCATTGCCGTTTTTG	Reverse
<i>gnrhr1</i>	GGGCGGGTGT TTATTAACCCTCACTAAA AGGCTCGCCTCTCCACAGTTATTT	Forward
	CCGGGGGGTGT TAATACGACTCACTATA GCGGGGCTGAAACCAATACCA	Reverse
<i>gnrhr2</i>	GGGCGGGTGT TTATTAACCCTCACTAAA GCGGACGCTCATGTTCTCAA	Forward
	CCGGGGGGTGT TAATACGACTCACTATA GGACAGCAATCTGTCCTCTGT	Reverse
<i>gnrhr3</i>	GGGCGGGTGT TTATTAACCCTCACTAAA GAAGAGTGTGGACTTCACGCA	Forward
	CCGGGGGGTGT TAATACGACTCACTATA GTCACGTACAGCGTCACAAAGT	Reverse
<i>gnrhr4</i>	GGGCGGGTGT TTATTAACCCTCACTAAA GCCGTTCTCAGATGTTCTCTGT	Forward
	CCGGGGGGTGT TAATACGACTCACTATA GAGGTAGTACGGAGTCCAGCA	Reverse

Para a hibridização *in situ* cromogênica (ISH), os tecidos foram fixados *overnight* em 4% paraformaldeído tamponado (pH 7,4) em condições livres de RNases, depois desidratados com uma série crescente de álcool, diafanizados com xilol e posteriormente incluídos em parafina (Paraplast®, Sigma). Foram realizados cortes histológicos de 5µm. Posteriormente as lâminas foram reidratadas em concentrações decrescentes de álcool e lavadas com PBT (tampão tris fosfato, pH: 7.4) e Tris HCl (0.05M, pH: 7.5). Logo após as lâminas foram tratadas com proteinase K (20ug/ml) à 37°C por 20min, re-fixadas e incubadas com solução de pré-hibridização por 2,5hrs. Após a desnaturação da sonda através de choque térmico, as lâminas foram incubadas com solução de hibridização com a sonda de RNA dos genes alvos à 70°C *overnight*. No segundo dia, a solução de hibridização foi removida e as lâminas foram lavadas intensamente com tampão citrato de sódio (SSC) e bloqueadas durante 2 h à temperatura ambiente com 1% de reagente de bloqueio (“blocking reagent”) (Roche). Em seguida, o material foi incubado com o anticorpo primário anti-DIG-AP (anti-digoxigenina conjugada com fosfatase alcalina) na diluição de 1:2000 na mesma solução de bloqueio à 4°C *overnight*. No terceiro dia, os tecidos foram lavados e incubados com solução de levamisol (0.24 mg/ml) no intuito de bloquear os sítios inespecíficos da fosfatase alcalina. O material foi revelado enzimaticamente através de nitroazul de tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP) e levamisol. A reação foi interrompida quando o tecido adquiriu coloração azulada. Posteriormente as lâminas foram fotografadas no microscópio invertido Leica DMI 4000 B.

2.6 Immunomarcção do GnRH3

Para localizar o GnRH3 nos diferentes órgãos (epitélio olfatório, retina e gônadas), técnica de imunohistoquímica foi empregada de acordo com Gomes e colaboradores (2013). Para tanto, os tecidos foram fixados em Bouin por 24h a 4°C, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 90%, 96% e 100%), diafanizados em xilol, incluídos em parafina (Paraplast®, Sigma) e seccionados com 5µm de espessura. Os cortes foram desparafinizados, rehidratados e submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se de peróxido de hidrogênio 0.3% em PBS (tampão fosfato salino, pH: 7.4) por 5 min. Após lavagens com PBS, o bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com soro normal de cabra 5%. Logo em seguida, o material foi incubado overnight a 4°C com o anticorpo primário. Dois anticorpos primários anti-GnRH3 (salmão) foram utilizados: o GF-6 (diluído 1:1000, gentilmente fornecido pela Dra. Nancy Sherwood, University of Victoria, Canadá) (Terasawa et al., 2001) e o BB8 (diluído 1:700, gentilmente fornecido pelo Dr. Olivier Kah, University of Rennes, França) (Breton, 1984). Após o período de incubação, os cortes foram lavados em PBS e incubados por 30 min no polímero-HRP EasyLink One (EasyPath). Em seguida, o material foi revelado com DAB (3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical) o tempo necessário até o material atingir a coloração desejada. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 min. Como controle negativo, os anticorpos primários foram pré-incubados por 2 h a temperatura ambiente em uma proporção de 1:5 com o análogo sintético do GnRH (1µM) (CONCEPTAL®, Intervet), diluído em PBS, no intuito de saturar os sítios de ligação dos anticorpos. Também como controle o anticorpo primário foi omitido em algumas das reações imunohistoquímicas.

2.7 Análise estatística

Os resultados da qPCR estão apresentados através da media \pm EP (erro padrão). As diferenças entre as medias da expressão por genes foram identificadas usando o teste não pareado Student-*t*est ($p < 0.05$). O software Graph Pad Prism 4.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com>) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

3 Resultados

3.1 Expressão do *gnrh2*, *gnrh3* e seus receptores (*gnrhr1,2,3* e *4*).

A expressão gênica das duas variantes de GnRH (*gnrh2*, *gnrh3*), do GnIH (*gnih*) e dos receptores (*gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3* e *gnrhr4*) foi avaliada em diferentes tecidos de machos e fêmeas adultos de zebrafish. Análises de RT-PCR mostram elevada expressão do *gnrh2* no encéfalo de ambos os sexos (Figura 1). O *gnrh3* foi expresso em todos os tecidos, com destaque para sua expressão elevada nos bulbos olfatórios (Figura 1). Os genes *gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3*, *gnrhr4* e *gnih* foram expressos em todos os tecidos avaliados (Figura 1). A expressão de *gnih* nos testículos amplificou duas bandas: a banda esperada de 133 pb e uma banda secundária de 200 pb aproximadamente.

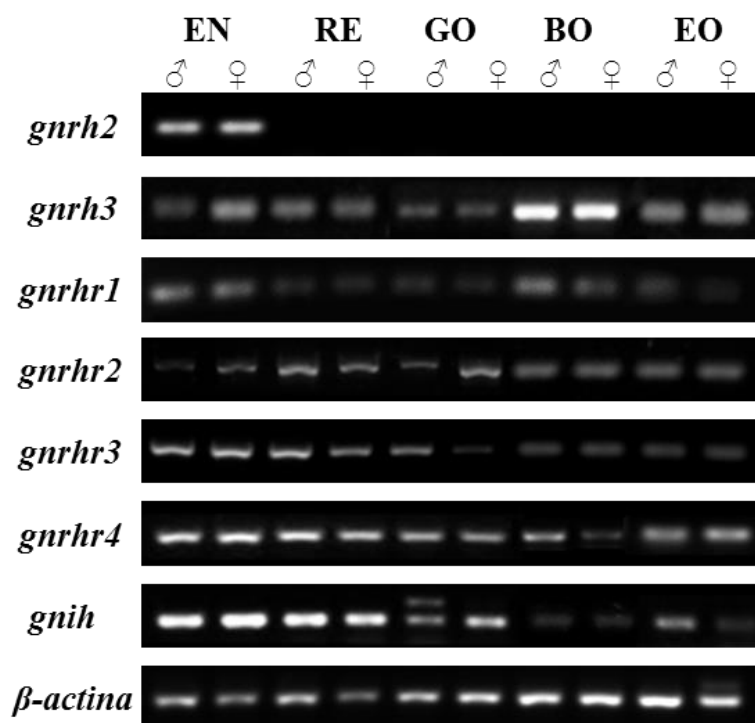


Figura 1. Expressão do GnRH (*gnrh2*, *gnrh3*), GnIH e os receptores (*gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3* e *gnrhr4*), nos diferentes tecidos (EN, encéfalo; RE, retina; GO, gônada; BO, bulbo olfatório e EO, epitélio olfatório) de zebrafish machos e fêmeas adultos. Amplificações do gene de β -actina foram realizadas para todos os tecidos como controle positivo.

3.2 Distribuição do *gnrhr4* na retina do zebrafish.

Através de hibridação *in situ* cromogênica, transcritos primários do *gnrhr4* foram identificados em três camadas da retina do zebrafish: camada nuclear externa (cne), camada nuclear interna (cni) e a camada das células ganglionares (ga) (Figura 2A). Na camada nuclear externa (cne), a expressão do *gnrhr4* ocorre nas células fotorreceptoras (Figura 2C). Na camada nuclear interna (cni), os transcritos primários ocorrem principalmente nos núcleos das células amácrinas e bipolares (Figura 2C). Por fim, na camada das células ganglionares, RNAm do *gnrhr4* encontra-se principalmente no núcleo das células ganglionares (Figura 2C). A sonda utilizada demonstrou-se específica, não sendo evidenciadas reações cruzadas ou marcações inespecíficas ao utilizar a sonda T3 (senso) (Figura 2B). Embora fossem testadas sondas para os genes *gnih*, *gnrhr1*, *gnrhr2* e *gnrhr3*, não foram evidenciadas marcações.

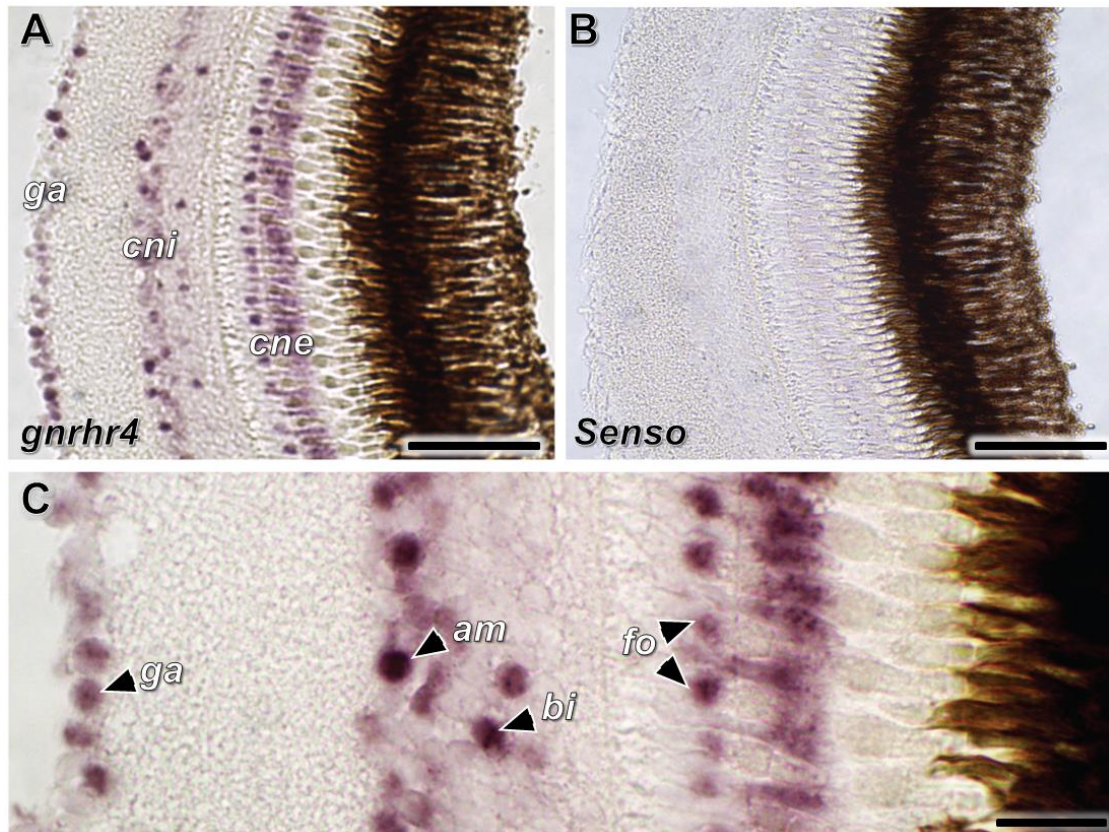


Figura 2. Distribuição do *gnrhr4* na retina do zebrafish por ISH. (A) Secção transversal da retina mostrando presença dos transcritos primários de *gnrhr4* na camada nuclear externa (cne), camada nuclear interna (cni) e na camada de células ganglionares (ga) quando tecidos foram incubados com sondas de RNA anti-senso (T7). (B) Controle da ISH, no qual o tecido foi incubado com a sonda senso (T3). (C) Detalhe da marcação específica nos núcleos dos fotorreceptores (fo), das células amácrinas (am), bipolares (bi) e ganglionares (ga). Barras: A e B= 50 μ m; C= 25 μ m.

3.3 Distribuição dos transcritos primários de *gnih*, *gnrhr2* e *gnrhr4* no ovário de zebrafish

Dentre as sondas avaliadas, os únicos RNAm que puderam ser detectados por ISH no ovário foram dos genes *gnih*, *gnrhr2* e *gnrhr4*. O *gnih* se expressa em oócitos de estágio de alvéolo cortical, principalmente nos alvéolos corticais (Figuras 3B,C). Não foi encontrada expressão em oócitos perinucleolares e em oócitos em vitelogênese. Além disso, *gnih* encontra-se bastante expresso nas células foliculares e na zona radiata dos oócitos vitelogênicos (Figura 3D).

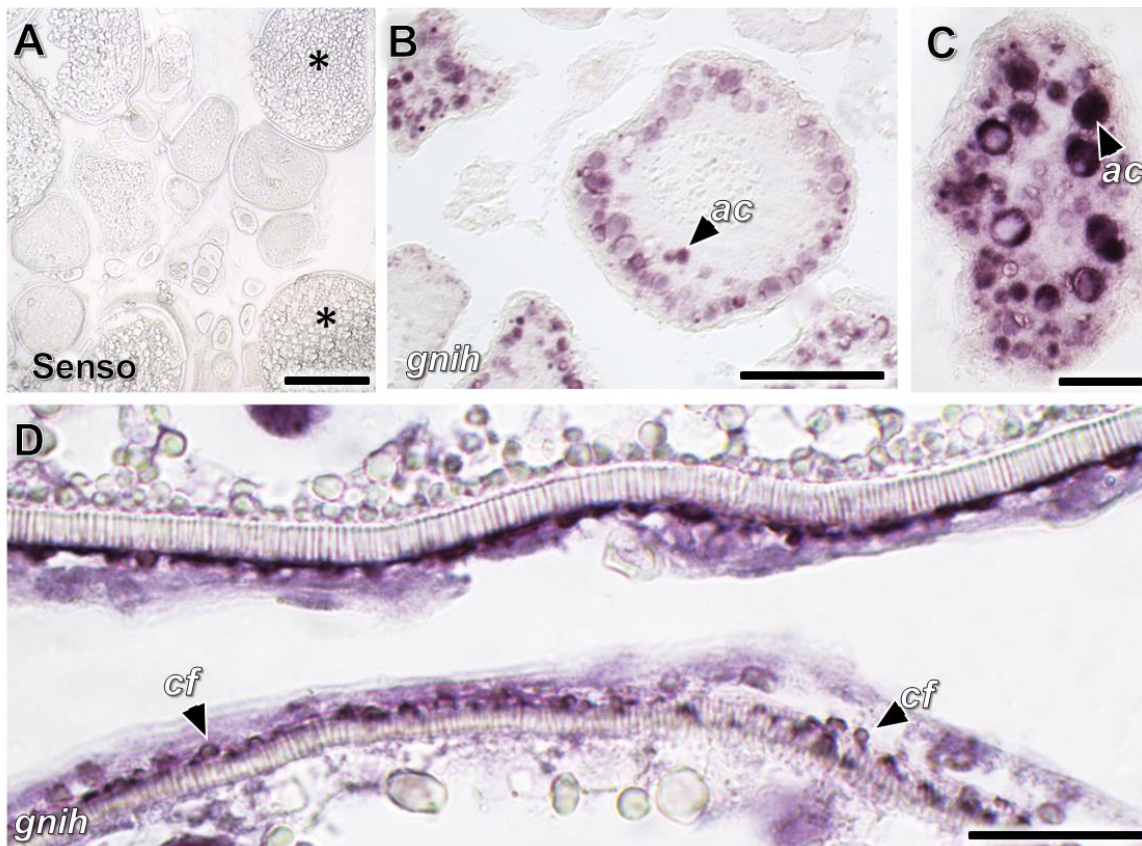


Figura 3. Distribuição dos transcritos primários de *gnih* no ovário de zebrafish. (A) Corte histológico do ovário incubado com sonda senso (T3). Notar a ausência de reações inespecíficas, o que comprova a especificidade da reação/sonda. (B,C) Expressão do *gnih* nos oócitos de estágio de alvéolo cortical, principalmente no interior dos alvéolos corticais (ac). (D) Detalhe da expressão do *gnih* nas células foliculares (cf) da camada granulosa dos ovócitos vitelogênicos. Barras: A= 250 μm ; B= 100 μm ; C, D= 25 μm .

O padrão de expressão do *gnrhr2* e *gnrhr4* foi bastante semelhante no ovário de zebrafish; seus transcritos primários ocorrem principalmente no citoplasma e no núcleo dos oócitos perinucleolares, sendo neste último mais intenso que no primeiro (Figuras 4B,C,E,F). Entretanto, à medida que os oócitos avançam no processo da vitelogenese, a expressão dos receptores diminui, se restringindo muitas vezes ao núcleo e às pequenas regiões do citoplasma (Figuras 4A,E). Além disso, *gnrhr4* também se expressa nas células foliculares e na zona radiata dos oócitos vitelogênicos (Figura 4H).

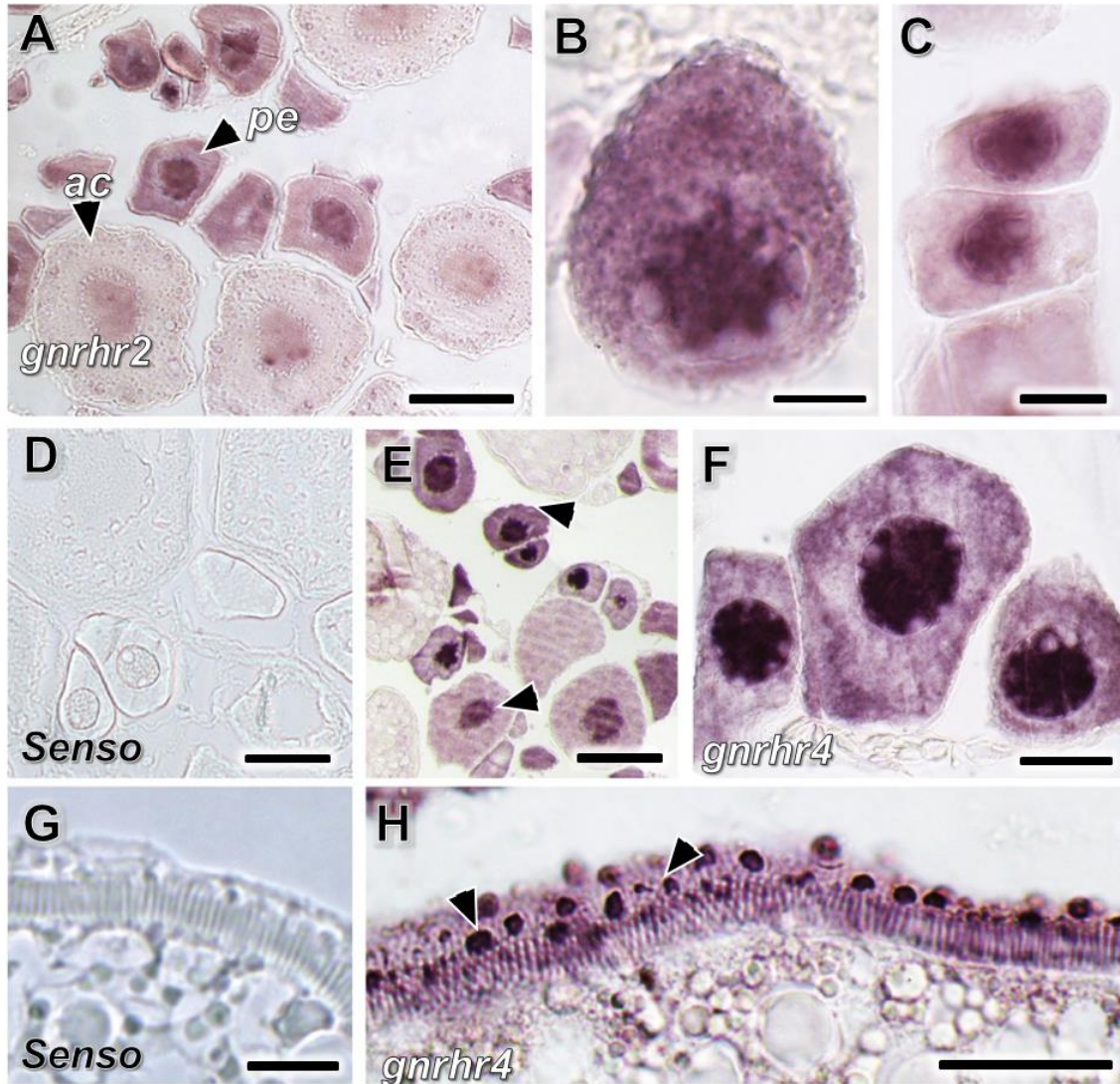


Figura 4. Distribuição do *gnrhr2* e *gnrhr4* no ovário de zebrafish. (A) Expressão do *gnrhr2* nos oócitos perinucleolares (pe) e sua redução nos oócitos de alvéolo cortical (ac). (B,C) Detalhe da expressão do *gnrhr2* no citoplasma e no núcleo dos oócitos perinucleolares. (D-G) Cortes histológicas de ovário incubados com sonda senso (T3), mostrando a especificidade da reação. (E) Detecção dos transcritos primários de *gnrhr4*, sendo bastante e principalmente expresso nos oócitos perinucleolares (cabeça de setas). (F) Detalhe da expressão específica do *gnrhr4* no núcleo e citoplasma dos oócitos perinucleolares. (H) Localização específica do *gnrhr4* nas células foliculares e zona radiata dos oócitos vitelogênicos (cabeça de setas). Barras: A,D,E= 100 μ m; B,C= 15 μ m; D= 250 μ m; G,F= 25 μ m.

3.4 Imunomarcação do GnRH3 no epitélio olfatório

As análises imunohistoquímicas revelaram a presença de fibras GnRH3 positivas na lamina própria de todas as lamelas da roseta olfatória do epitélio olfatório de machos e fêmeas de zebrafish (Figura 5A). Utilizando-se o anticorpo BB8 (Figura 5C), a marcação mostrou-se mais intensa quando comparado ao GF-6 (Figura 5D). Não foram encontradas fibras marcadas quando os anticorpos primários foram incubados junto com a molécula sintética de GnRH (Figura 5B).

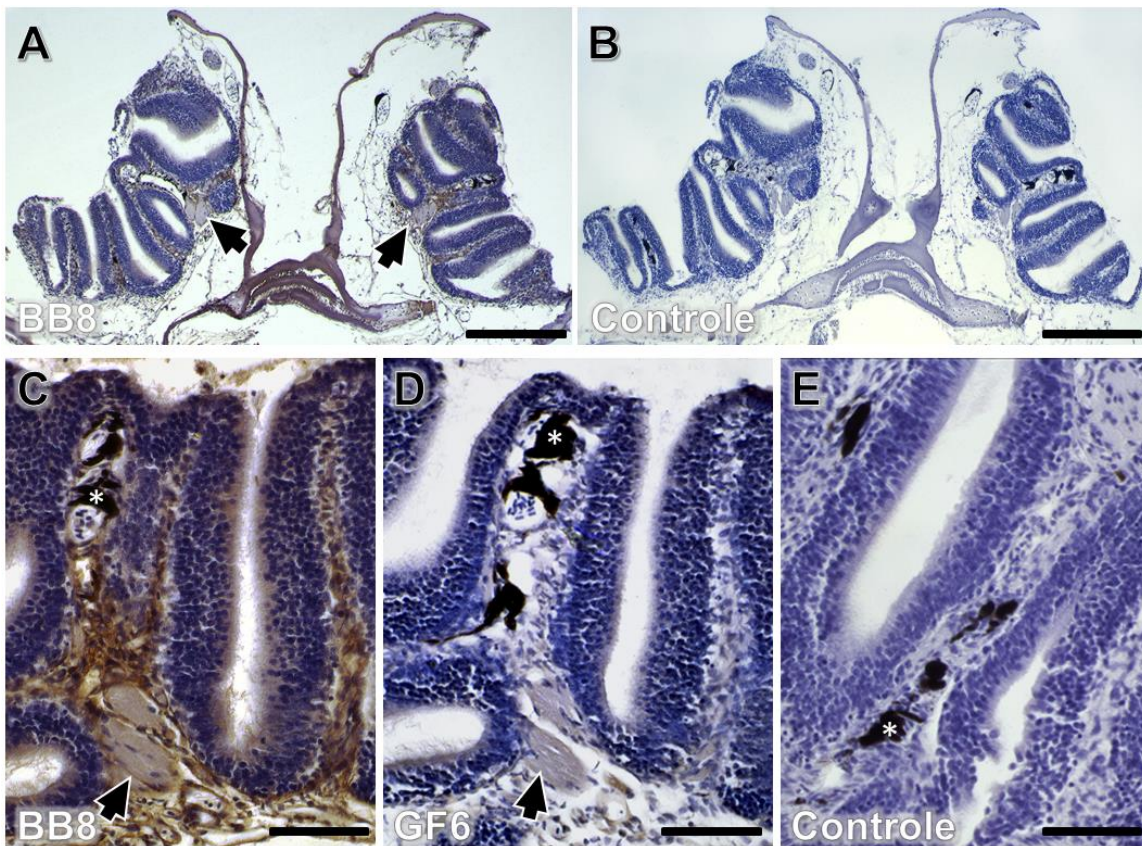


Figura 5. Imunodeteção do GnRH3 no epitélio olfatório de zebrafish. (A) Secção transversal mostrando a presença de fibras GnRH3 na lamina própria das lamelas olfatórias. Note a presença de fascículos de fibras GnRH3 positivas que darão origem ao nervo olfatório (seta preta). (B) Controle negativo obtido a partir da incubação dos anticorpos primários com a molécula sintética de GnRH. (C) Imunomarcação das fibras GnRHergicas utilizando o anticorpo BB8 (seta preta). (D) Imunomarcação das fibras GnRHergicas utilizando o anticorpo GF-6 (seta preta). (E) Controle negativo obtido pela omissão dos anticorpos primários. Notar que alguns cromatóforos (asteriscos) também estão presentes na lamina própria do epitélio. Barras: A e B= 250 μ m; C, D e E= 25 μ m.

Além das fibras, também foi encontrada imunoreatividade ao GnRH3 no citoplasma dos neurônios do receptor olfatório (Figura 6A), especialmente na região apical (Figura 6C), ressaltando também marcação nos cílios (Figura 6C). Foi possível observar fascículos de fibras

nervosas intensamente marcadas para GnRH3 tanto na lamina própria das lamelas associadas a vasos sanguíneos (Figura 6D), ou entre as lamelas fascículos de fibras direcionados no sentido do bulbo olfatório (Fig. 6E). A pré-incubação do anticorpo com o peptídeo sintético de cGnRH3 não apresentou marcação, confirmando a especificidade da imunomarcação (Figura 7B).

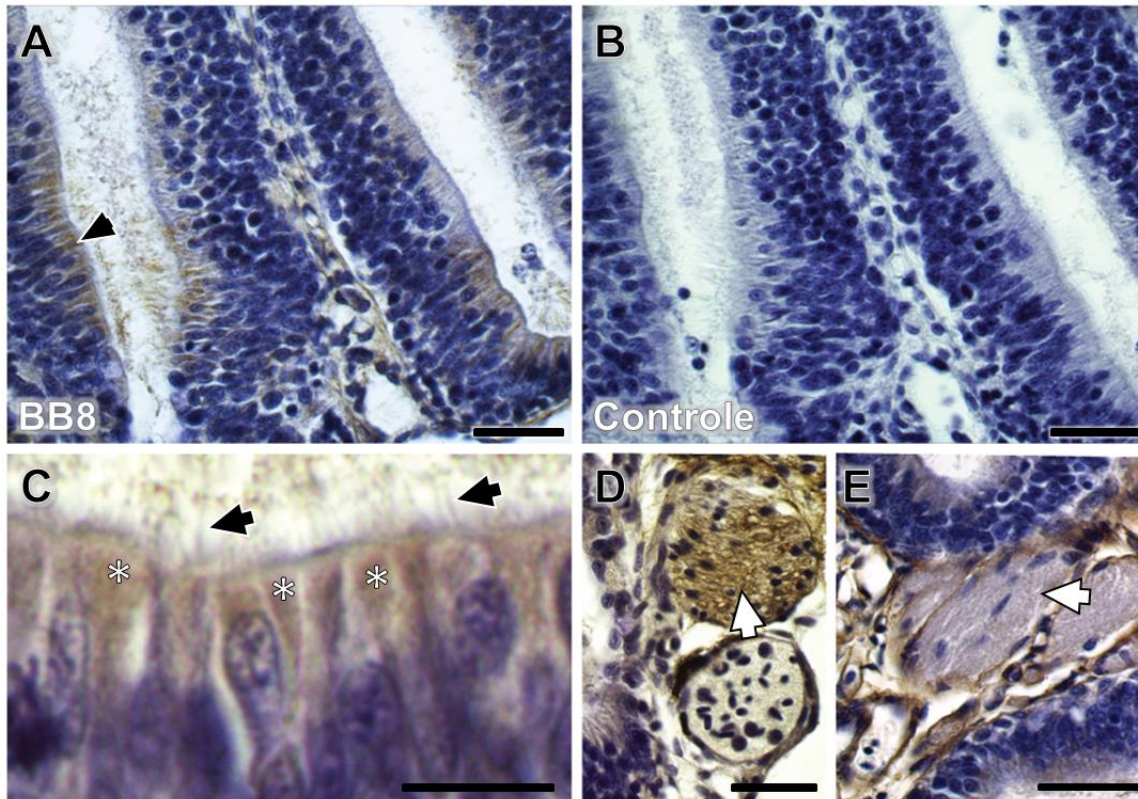


Figura 6. Imunodeteccção de GnRH3 no epitélio olfatório de zebrafish. (A) Secção transversal mostrando a marcação de GnRH3 na região apical do epitélio sensorial (cabeça de seta). (B) Controle negativo. (C) Detalhe da região apical dos neurônios receptores olfatórios (asteriscos), destacando especialmente os cílios marcados (seta). (D) e (E) Detalhe dos fascículos de fibras GnRH3 positivas localizados entre as lamelas olfatórias, que posteriormente formarão o nervo olfatório (setas brancas). Barras: A e B= 25 μ m; C= 10 μ m; D e E= 25 μ m.

3.5 Imunomarcação do GnRH3 na retina

Diferentes padrões de imunorreatividade foram observados na retina de zebrafish dependendo do tipo de anticorpo utilizado (BB6 ou GF-6) (Figuras 7A,C,E). Com o anticorpo BB8, a marcação do GnRH3 ocorreu em 4 regiões: em cones e bastonetes; em fibras da camada plexiforme externa (cpe) e interna (cpi); e nas fibras das células ganglionares que formam o nervo óptico (fno) (Figura 7C). Já com o anticorpo GF6, a marcação é exclusiva nas fibras das células ganglionares que formam o nervo óptico (Figuras 7A,E). Nenhum dos controles apresentou marcação (Figuras 7B,D,F).

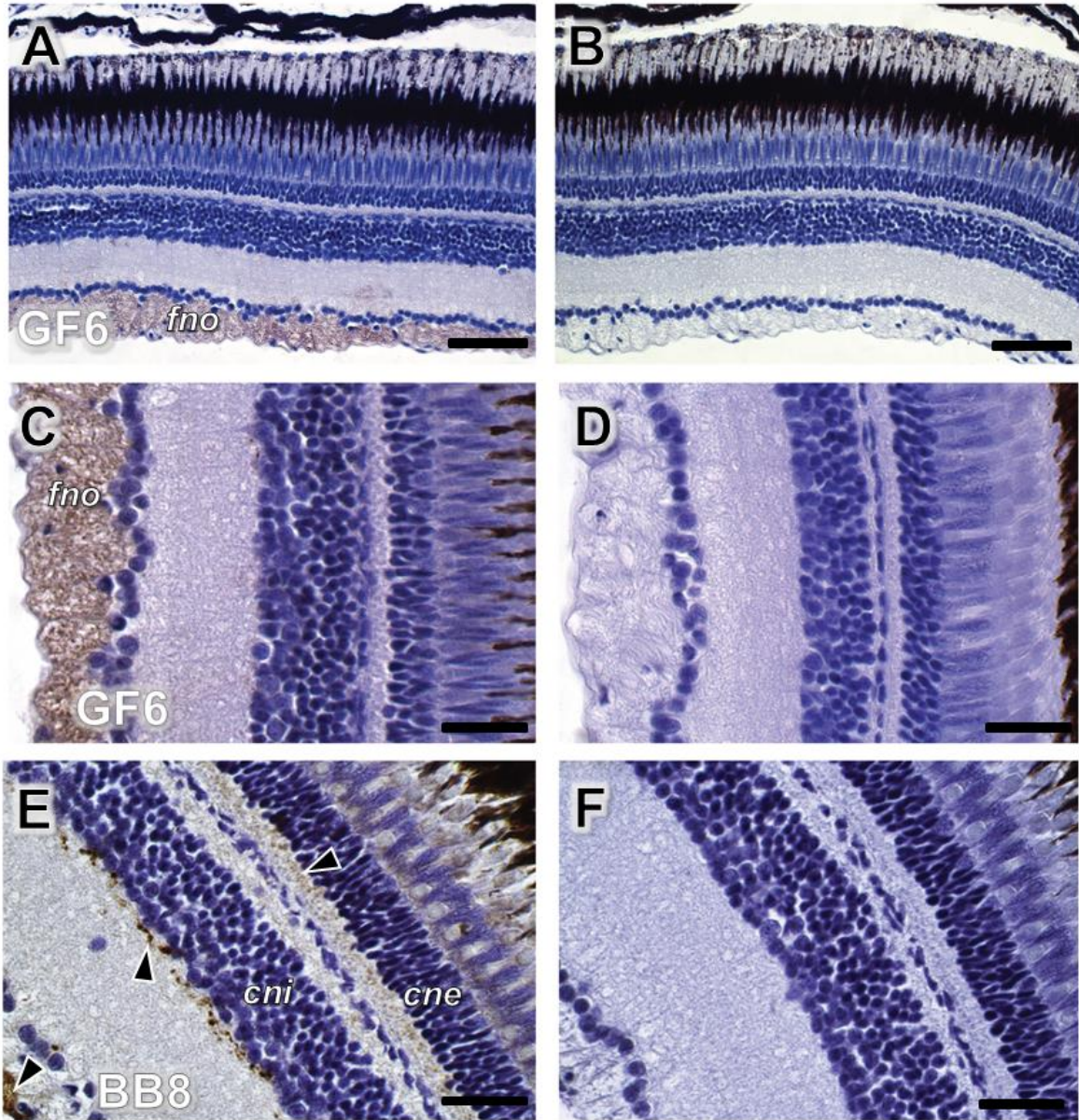
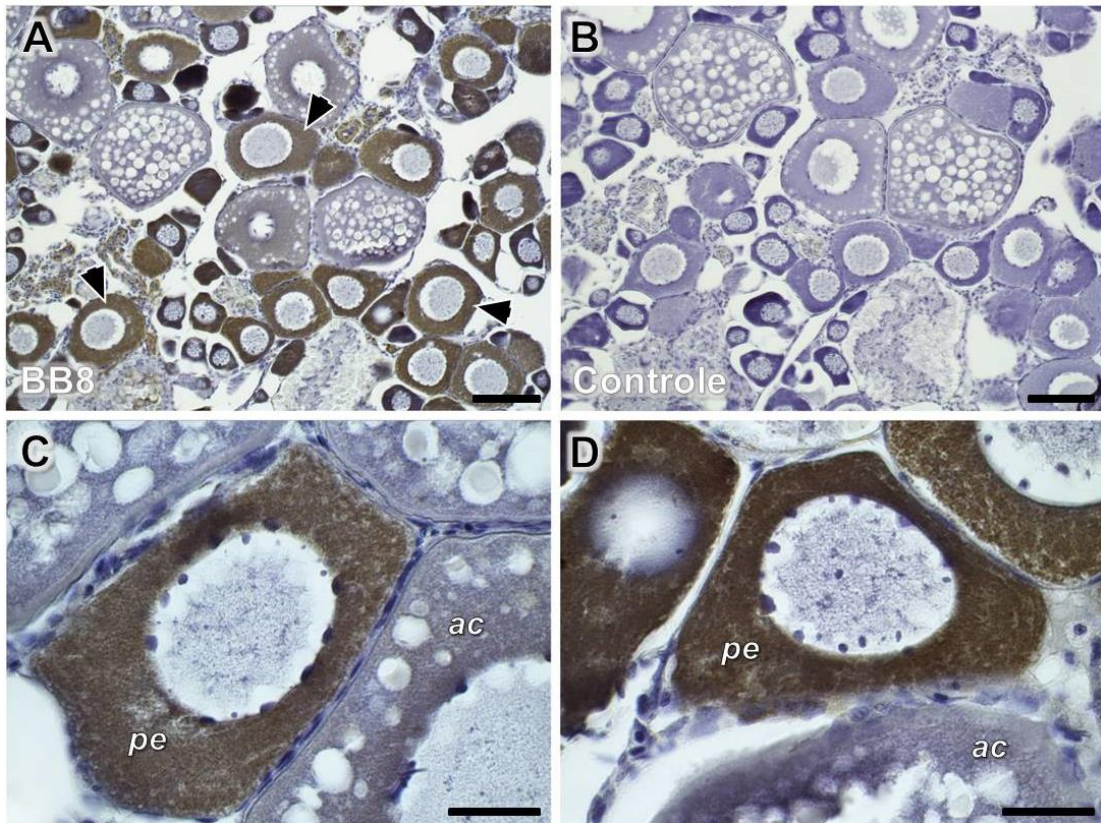


Figura 7. Imunodeteção de GnRH3 na retina de zebrafish. Panorâmica da retina incubada com o anticorpo GF6 (A) e seus respectivos controles (omissão do anticorpo primário ou anticorpo neutralizado com seu peptídeo sintético alvo) (B). (C) Imunomarcção do GnRH3 utilizando o anticorpo BB8, mostrando as fibras marcadas na camada nuclear interna (cni), plexifome externa (cpe) e fibras das células ganglionares que formam o nervo óptico (fno). (E) Imunomarcção de GnRH3 utilizando o anticorpo GF6, mostrando reatividade nas fibras das células ganglionares que formam o nervo óptico. Os controles (D e F) não apresentaram nenhuma marcação. Barras: A e B= 50 μ m; C, D, E e F= 25 μ m.

3.6 Imunomarcção do GnRH3 no ovário.

Nos ovários de zebrafish, os oócitos em crescimento primário (oócitos perinucleolares) e os oócitos em estágio de alvéolo cortical são as únicas estruturas imunorreativas ao anticorpo

anti-GnRH3 BB8, (Figuras 8A,C,D). Nos oócitos perinucleolares, a marcação ocorre fortemente no citoplasma destas células (Figuras 8A,C,D), enquanto que nos oócitos em estágio de alvéolo cortical, a imunorreatividade também é citoplasmática, porém menos intensa quando comparada com o primeiro (Figuras 8C,D). De forma geral, a intensidade da marcação diminui nos oócitos com estágios de maturação mais avançados. A especificidade da reação foi comprovada nos controles ao omitir o anticorpo primário ou quando o anticorpo foi saturado com seu peptídeo



sintético alvo (Figura 8B).

Figura 8. Imunodeteção de GnRH3 no ovário de zebrafish. (A) Corte transversal de um ovário de zebrafish, mostrando imunomarcagem do GnRH3 nos oócitos perinucleolares (cabeças de seta) quando utilizado o anticorpo BB8. (B) Controle negativo (omissão do anticorpo primário ou anticorpo neutralizado com seu peptídeo sintético alvo). (C e D) Detalhe da intensa imunorreatividade ao GnRH3 no citoplasma dos oócitos perinucleolares (pe). Notar que, a imunomarcagem do GnRH3 diminui no citoplasma dos oócitos em estágio de alvéolo cortical (ac). Barras: A e B= 100 μ m; C, D= 25 μ m.

3.7 Expressão do *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, *gnrhr1*, 2, 3 e 4 no epitélio olfatório

A expressão dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, *gnrhr1*, 2, 3 e 4 foi avaliada no epitélio olfatório durante os diferentes estágios de desenvolvimento ovariano (crescimento primário, CP; pré-vitelogênese, PV; vitelogênese intermediária, VI; e vitelogênese tardia, VT) conforme ilustra a Figura 9A. A expressão do *gnrh2* no epitélio olfatório foi significativamente maior durante a VI

em relação aos outros estágios (Figura 9B). Já a expressão do *gnrh3* se manteve constante diminuindo significativamente somente no estágio de PV (Figura 9B). A expressão do *gnih* apresentou-se variável entre os indivíduos, porém com tendência de diminuir no estágio de PV (Figura 9B).

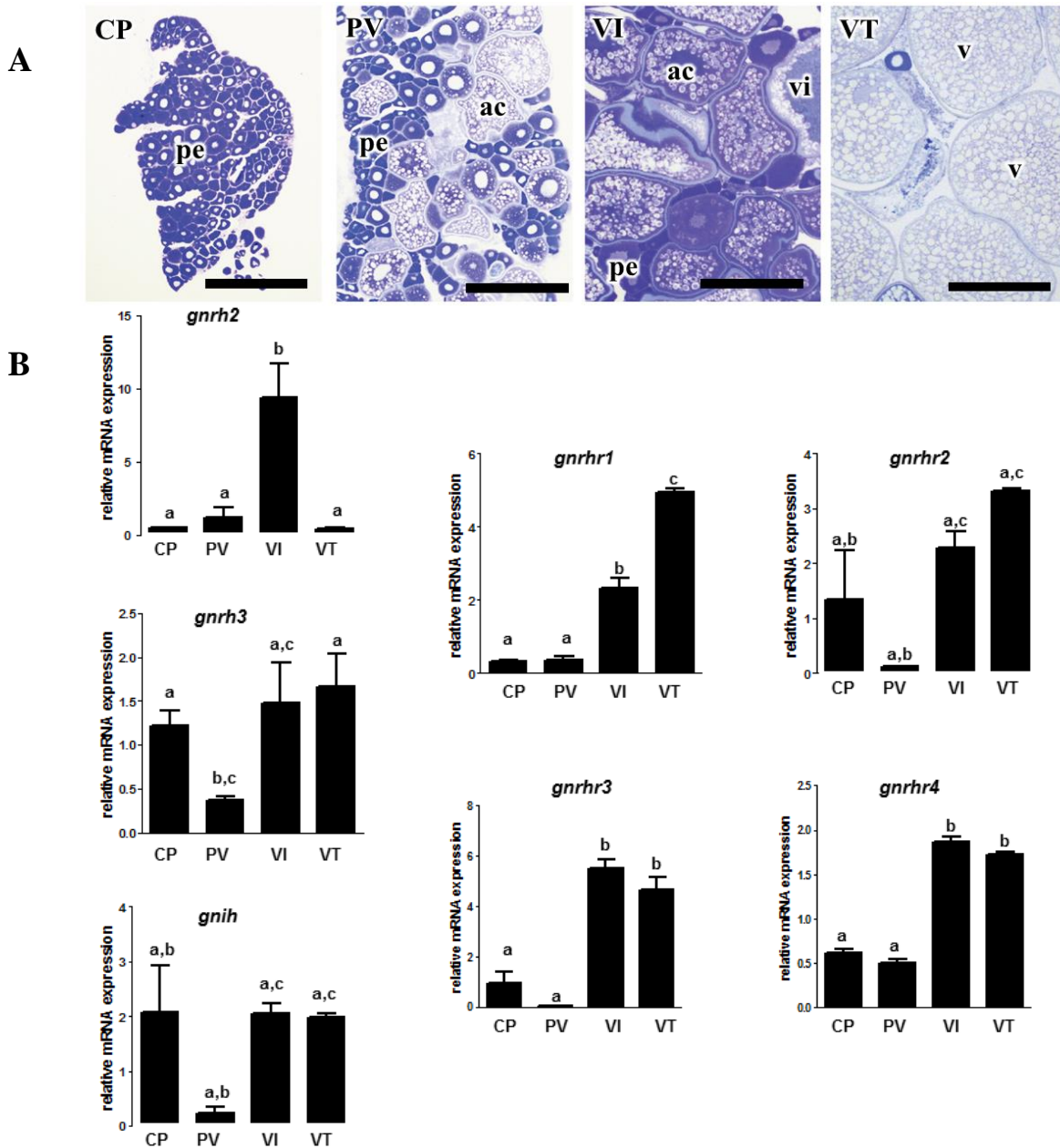


Figura 9. (A) Morfologia do ovário nos diferentes estágios de maturação. CP, crescimento primário (ovário com abundantes oócitos perinucleolares (pe)); PV, pré-vitelogênese (ovário apresenta numerosos oócitos em estágio de alvéolo cortical (ac) assim como oócitos perinucleolares); VI, vitelogênese intermediária (ovário apresenta oócitos em vitelogênese inicial (vi) e alguns alvéolos corticais) e VT vitelogênese tardia (ovário composto principalmente por oócitos vitelogênicos(v)). Barra 500 μ m. (B) Expressão dos *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1*, 2, 3, 4 no epitélio olfatório de fêmeas de zebrafish em quatro estágios de maturação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.

A expressão do *gnrhr1* no epitélio olfatório aumentou ao longo da maturação sendo significativamente maior na VT (Figura 9B). A expressão do receptor *gnrhr2* foi variável no estágio de CP, aumentando significativamente nos últimos estágios de maturação (VI, VT) (Figura 9B). O *gnrhr3* e o *gnrhr4* apresentaram um padrão de expressão semelhante; a expressão nos estágios finais (VI, VT) foi significativamente maior em relação aos estágios iniciais (CP, PV) (Fig. 9B).

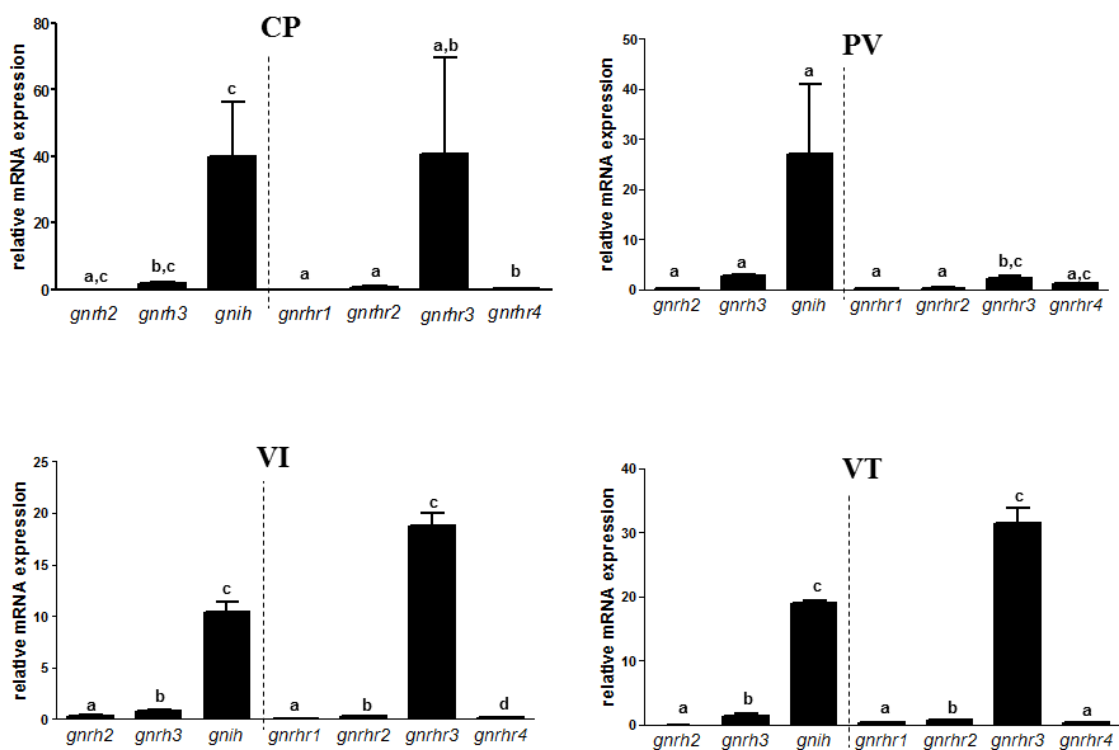


Figura 10. Expressão dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no epitélio olfatório de fêmeas de zebrafish por estágio de maturação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os genes ligantes (*gnrh2*, *gnrh3* e *gnih*) e os receptores (*gnrhr1,2,3,4*). CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia.

Também foi realizada uma comparação da expressão dos genes por estágio de maturação (Figura 10). Interessantemente, o *gnih* foi significativamente o gene mais expresso no epitélio olfatório dentre os ligantes em todos os estágios de maturação. Dos receptores, o *gnrhr3* foi significativamente mais expresso ao longo do processo de maturação (Figura 10).

3.8 Expressão do *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, *gnrhr1*, 2, 3 e 4 no bulbo olfatório

Para o caso do bulbo olfatório, a expressão do *gnrh2* é baixa nos estágios de CP, PV e VI, aumentando significativamente no estágio final de vitelogênese (VT) (Figura 11). Em contrapartida, o *gnrh3* tem um pico de expressão no estágio de PV, significativamente diferente em relação aos outros estágios (Figura 11). Os níveis de RNAm de *gnih* mantêm-se constantes ao longo dos estágios de maturação do ovário (CP, VI, VT), com exceção no estágio de PV em que sua expressão apresenta-se bastante reduzida (Figura 11).

Os receptores *gnrhr1* e *gnrhr4* apresentaram um padrão de expressão semelhante, na qual sua expressão é significativamente menor no estágio de VI em relação aos demais estágios (Figura 11). Por outro lado, expressão dos receptores *gnrhr2* e *gnrhr3* é significativamente menor em PV, enquanto que nos outros estágios, a expressão dos mesmos mantém-se constante (Figura 11).

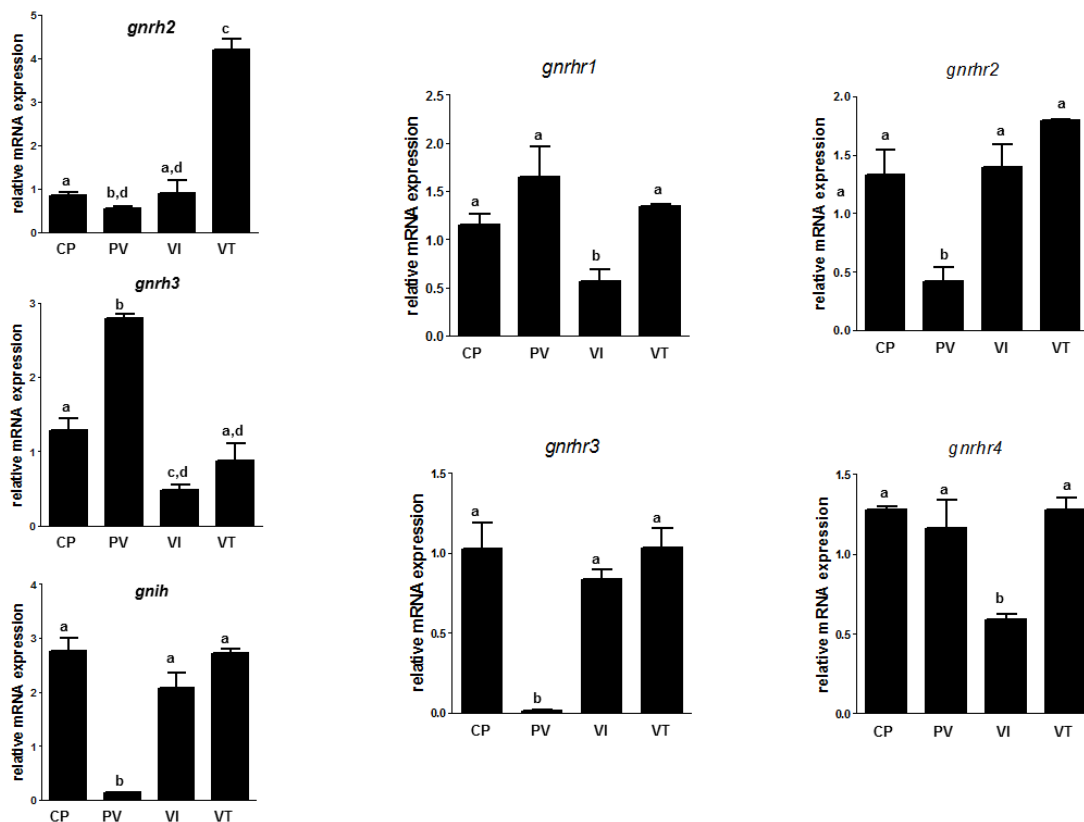


Figura 11. Expressão do *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no bulbo olfatório de fêmeas de zebrafish em quatro estágios de maturação. CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.

Ao comparar a expressão dos ligantes por estágio, é notável que o *gnih* é o ligante mais expresso nos estágios de CP, VI e VT (Figura 12). Interessantemente, no estágio de PV, o *gnrh3* apresenta-se bastante expresso em relação aos demais ligantes, e neste estágio o *gnih* diminui significativamente sua expressão (Figura 12). É notável a correlação inversa entre *gnrh3* e *gnih* no bulbo olfatório durante todos os estágios de maturação (Figura 12). Entre os receptores destaca-se o *gnrhr3* que é significativamente mais expresso nos estágios CP, VI e VT, sendo menos expresso somente no estágio PV, onde o *gnrhr4* é mais expresso (Figura 12).

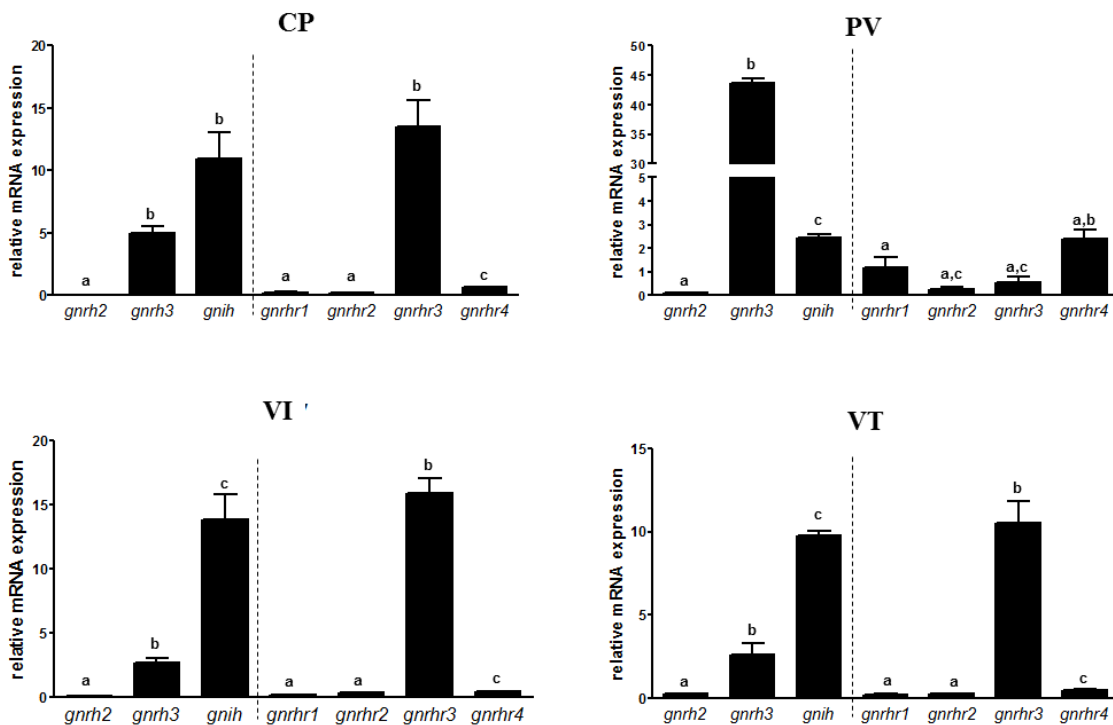


Figura 12. Expressão dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no bulbo olfatório de fêmeas de zebrafish por estágio. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os genes ligantes (*gnrh2*, *gnrh3* e *gnih*) e os receptores (*gnrhr1,2,3,4*). CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia.

3.9 Expressão do *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, *gnrhr1*, 2, 3 e 4 na retina

Na retina, os níveis dos transcritos primários de *gnrh2* e *gnrh3* mantiveram-se constantes na retina durante todos os estágios de maturação do ovário (Figura 13). Por outro lado, a expressão do *gnih* manteve-se constante nos estágios iniciais, diminuindo significativamente em relação aos demais no estágio final (VT) (Figura 13). Em relação aos receptores, não houveram alterações nos níveis de RNAm dos receptores *gnrhr2* e *gnrhr3* ao longo dos estágios de maturação ovariana (Figura 13). Os receptores *gnrhr1* e *gnrhr4* apresentaram um padrão

semelhante ao longo dos estágios; sua expressão é elevada no estágio de CP e significativamente diminui conforme a maturação, sendo menor em PV para *gnrhr1*, e menor em VT para *gnrhr4* (Figura 13).

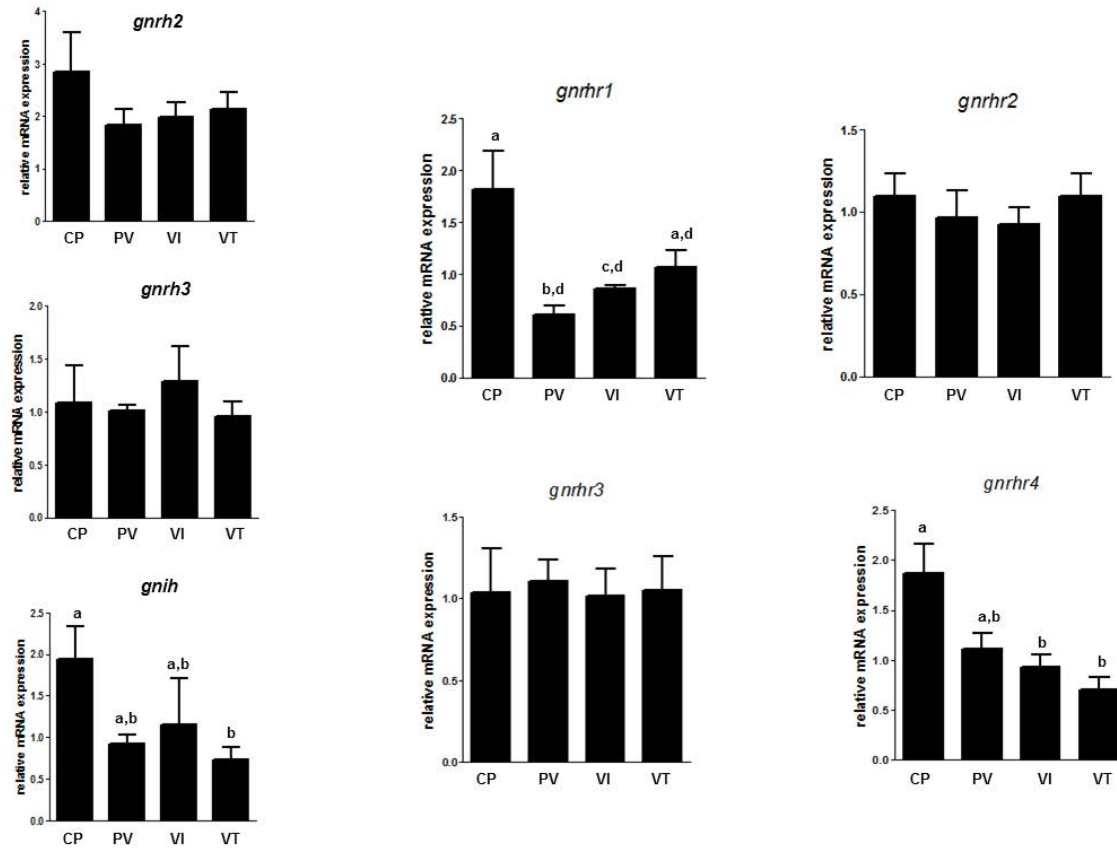


Figura 13. Expressão dos *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* na retina de fêmeas *zebrafish* em quatro estágios de maturação. CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.

Na retina, o *gnrh3* foi o gene significativamente mais expresso em todos os estágios de maturação quando comparado com os outros ligantes (Figura 14). Dos receptores, destaca-se a expressão significativa do *gnrhr4* em todos os estágios seguido do *gnrhr3* (Figura 14). Interessante notar que os níveis de RNAm dos receptores *gnrhr3* e *gnrhr4* são iguais no estágio final de maturação (VT) (Figura 14).

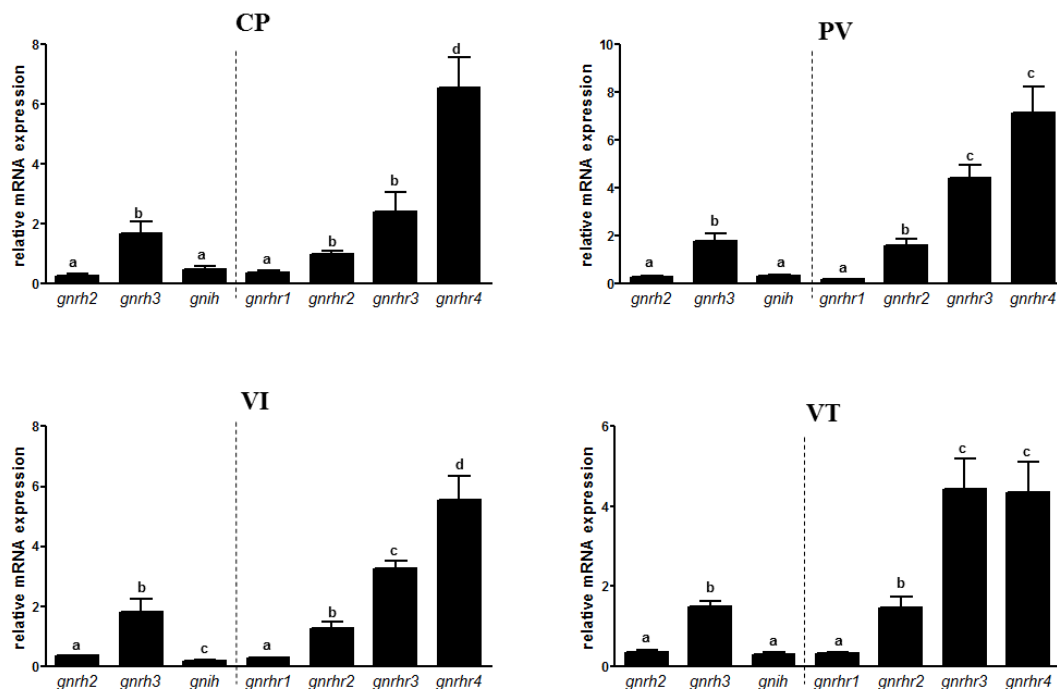


Figura 14. Expressão dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* na retina de fêmeas de zebrafish por estágio. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os genes ligantes (*gnrh2*, *gnrh3* e *gnih*) e os receptores (*gnrhr1,2,3,4*). CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia.

3.10 Expressão do *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, *gnrhr1*, 2, 3 e 4 no ovário

No ovário, a expressão do *gnrh2* manteve-se constante ao longo dos estágios de maturação, com tendência a reduzir-se no estágio de PV (Figura 15). Os transcritos primários de *gnrh3*, no entanto, não se alteraram durante os estágios de maturação (Figura 15). Interessantemente, o *gnih* apresentou um padrão de expressão elevado no estágio de CP, reduzindo-se significativamente nos demais estágios (PV, VI, VT) (Figura 15). Em relação aos receptores, três padrões de expressão são observados (Figura 15). O *gnrhr1* apresenta expressão estável ao longo do estágio de maturação, como tendência, porém não significativa, de aumentar seus níveis de expressão no estágio final (Figura 15). O *gnrhr2* e *gnrhr3* mostram mesmo padrão de expressão do *gnih*; os níveis de RNAm destes genes são elevados no CP e diminuem significativamente nos estágios de PV, VI, VT (Figura 15). Por fim, o *gnrhr4* diminui sua expressão gradativamente ao longo da maturação ovariana, tendo baixos níveis relativos de RNAm no estágio final (VT) (Figura 15).

Entre os genes ligantes destaca-se a expressão do *gnih* no ovário de zebrafish (Figura 15). Dos receptores, *gnrhr2* tem maior expressão no estágio final (VT), e juntamente com o *gnrhr3*, constituem os receptores mais expressos nos ovários ao longo de toda maturação (Figura 16).

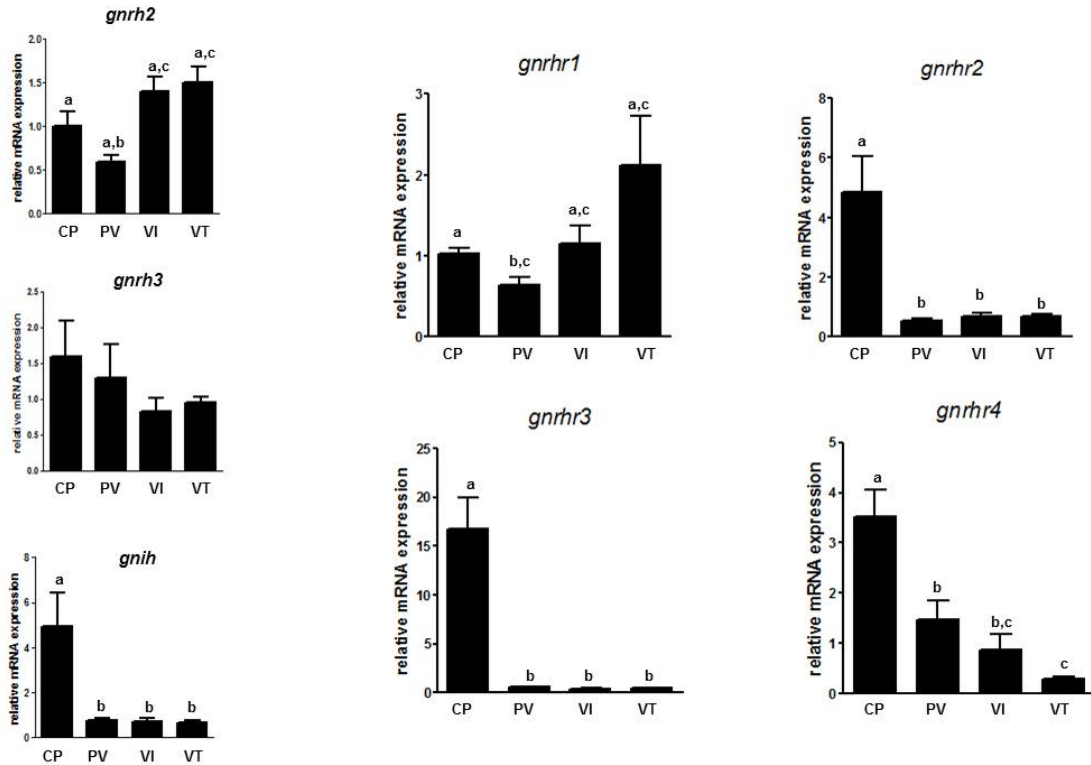


Figura 15. Expressão dos *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnhr1,2,3,4* no ovário zebrafish em quatro estágios de maturação. CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.

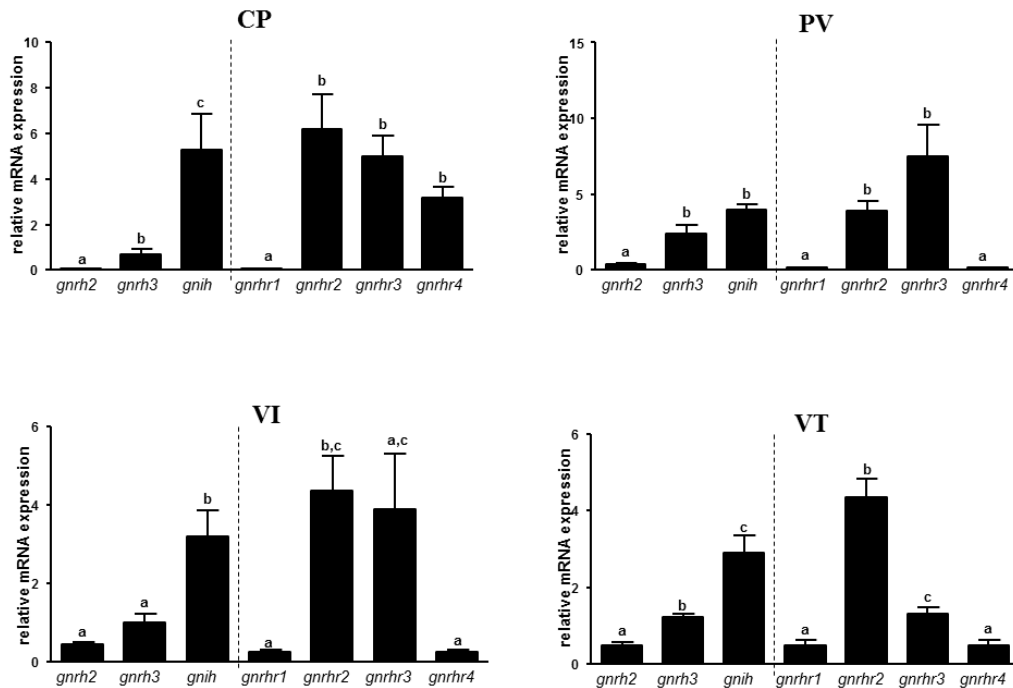


Figura 16. Expressão por estágio dos genes *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnhr1,2,3,4* no ovário de zebrafish. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os genes ligantes (*gnrh2*, *gnrh3* e *gnih*) e os receptores (*gnhr1,2,3,4*). CP, crescimento primário; PV, pré-vitelogênese; VI, vitelogênese intermediária e VT vitelogênese tardia.

Discussão

3.1 GnRH/GnIH no eixo epitélio olfatório-bulbo-retina de zebrafish

Nos peixes, o sistema olfato-retinal é originado pelos corpos celulares do nervo terminal, os quais estão localizados no bulbo olfatório. Estes neurônios prolongam seus axônios para várias regiões do encéfalo, assim como para o epitélio olfatório e a retina (Kawai et al., 2009). O presente trabalho, de forma inédita, analisa as variações na expressão gênica do *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, e das diferentes isoformas do receptor de GnRH (*gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3*, *gnrhr4*) nos três componentes do sistema olfato-retinal (epitélio olfatório, bulbo e retina) durante os 4 estágios de maturação ovariana (crescimento primário, pré-vitelogênese, vitelogênese intermediária, e vitelogênese tardia). A escolha das fêmeas para tanto, justifica-se pela facilidade de estagiar o desenvolvimento ovariano, ao contrário, dos machos, nos quais a espermatogênese é praticamente contínua. Por fim, este trabalho também analisou a expressão dos genes listados acima (*gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, *gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3* e *gnrhr4*) nos ovários de zebrafish ao longo dos diferentes estágios de maturação.

3.1.1 Epitélio olfatório

Fêmeas adultas de zebrafish expressam em seu epitélio olfatório todas as moléculas do sistema GnRH/GnIH (ligantes e receptores). De um modo geral, os ligantes apresentam-se pouco expressos no epitélio olfatório; com destaque para o *gnih* como o mais expresso, seguido na sequência pelo *gnrh3* e *gnrh2*, como as formas menos expressas. Estes resultados demonstram que o nervo terminal não é a única fonte de GnRH no epitélio olfatório, como mostrado anteriormente (Yamamoto et al., 1995; Amano et al., 2002; Kawai et al., 2009). As próprias células do epitélio olfatório também são produtores de GnRH, GnIH e de seus receptores. Apesar da baixa expressão impossibilitar a detecção dos sítios de expressão destas moléculas por hibridização *in situ*, as análises de imunohistoquímica revelaram que o GnRH3 localiza-se nas fibras nervosas do nervo olfatório, assim como na parte apical das células olfatórias neuroepiteliais e nos cílios destas. A presença de GnRH3 nos neurônios do receptor olfatório (NRO) do zebrafish é consistente com estudos prévios em outras espécies de teleostes (Subhedra e Krishna, 1988; Biju et al., 2003; Biju et al., 2005; Kawai et al., 2009). Tais estudos mostram que o GnRH3 parece ter um importante papel na regulação da transmissão da informação olfatória. Além disso, a intensa marcação de GnRH3 na região dendrítica apical dos neurônios do receptor olfatório, especialmente nos cílios, também foi descrita em carpa *Cirrhinus mrigala* (Biju et al., 2005). Tal

marcação é bastante interessante, pois estudos demonstraram que na membrana dos cílios existem receptores que se ligam com odorantes específicos e traduzem a informação quimiosensorial do ambiente (Schild e Restrepo, 1998). Embora não seja claro o mecanismo pelo qual o GnRH modula a resposta olfatória sobre os NRO do epitélio olfatório, existe a possibilidade que o GnRH regule a transdução do sinal olfatório (Kawai et al., 2009) ao modular a excitabilidade dos NRO aumentando sua resposta a moléculas odorantes (Eisthen et al., 2000; Kawai et al., 2009)

Ao analisar a expressão das moléculas do sistema GnRH/GnIH no epitélio olfatório durante a maturação ovariana de zebrafish, nota-se que com exceção do *gnrh2* (que tem um pico na vitelogênese intermediária), o *gnih* e o *gnrh3* possuem expressão elevada na fase final (vitelogênese tardia) quando comparadas com o início da vitelogênese (pré-vitelogênese). Este padrão também ocorre com os receptores (*gnrhr1*, *gnrhr2*, *gnrhr3* e *gnrhr4*), cuja expressão aumenta na vitelogênese final em comparação com a pré-vitelogênese. Estes dados sugerem que o epitélio poderia estar mais receptivo às moléculas de GnRH nos estágios finais de maturação gonadal. Reforçando esta idéia de que o epitélio é mais responsivo ao GnRH no final da maturação, estudos em salamandras demonstraram que a quantidade de neurônios do receptor olfatório (NRO) que respondem ao GnRH é o dobro na época reprodutiva quando comparado com a época não reprodutiva (Eisthen et al., 2000; Zhang e Delay, 2007).

3.1.2 Bulbo olfatório

No bulbo olfatório, o *gnrh3* e *gnih* foram as formas mais expressas do sistema GnRH/GnIH. No entanto, dependendo do estágio de maturação gonadal uma forma foi mais predominante sobre a outra e vice-versa. Por exemplo, nos estágios de crescimento primário, vitelogênese intermediária e vitelogênese tardia, a expressão do *gnih* foi maior do que a do *gnrh3*. Por outro lado, na pré-vitelogênese, a expressão relativa do *gnrh3* foi extremamente maior que a do *gnih*. Em vários grupos de animais, o GnIH pode inibir a síntese e a liberação de gonadotropina (Fsh e Lh) por diminuir a atividade dos neurônios GnRH-I, assim como inibir diretamente o efeito do GnRH nas células gonadotrópicas (Tsutsui et al., 2012). Sabendo-se que o GnRH1 é a forma hipofisiotrópica, e que em zebrafish, ela é representada pelo GnRH3, é possível que o GnIH regule também a liberação de GnRH3 no bulbo de zebrafish, uma vez que neste trabalho, demonstra-se, de forma inédita, uma relação inversa entre a expressão de *gnih* e *gnrh3* no bulbo. Estudos em goldfish demonstraram que os corpos celulares das células produtoras de GnIH estão localizados no gânglio do nervo terminal (que está localizado dentro do bulbo olfatório) e dele partem fibras que inervam várias regiões do encéfalo incluindo a hipófise (Sawada et al., 2002). Além de seu possível papel modulatório nos neurônios GnRH3, é provável que as variações na expressão do *gnih* no bulbo também tenham reflexo em outras regiões do

encéfalo, como na hipófise, por exemplo. Semelhantemente, as variações na expressão do *gnrh3* também podem ter reflexo e efeitos em outras regiões do encéfalo, principalmente associados com a pré-vitelogênese, uma vez que sua expressão foi maior neste estágio. Em relação aos níveis de *gnrh2*, observa-se um aumento de sua expressão apenas no estágio de vitelogênese tardia.

Embora o GnRH2 seja a forma mais conservada entre os vertebrados, sua função ainda é pouco conhecida. Estudos demonstram que o GnRH2 estimula o comportamento sexual de fêmeas de mamíferos (Barnett et al., 2006), aves (Maney et al., 1997) e peixes (Volkoff e Peter, 1999). No encéfalo de goldfish, os níveis de RNAm de GnRH2 estão correlacionados com o comportamento de desova (Volkoff e Peter, 1999). Além disso, estudo bastante recente demonstrou elegantemente em zebrafish o aumento de projeções de fibras de GnRH2 provenientes do bulbo (gânglio do nervo terminal) na hipófise quando os animais eram submetidos a jejum prolongado (Xia et al., 2014). Uma vez que o jejum altera o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Bhatnagar et al., 2006), tais autores sugerem fortemente que o GnRH2 desempenha um papel na nutrição, metabolismo e comportamento (Xia et al., 2014). Esta hipótese também suporta nossas observações de que os níveis elevados de expressão do *gnrh2* no bulbo de fêmeas em vitelogênese tardia possam estar relacionados com o possível papel do GnRH2 no comportamento sexual das fêmeas e/ou estar envolvido em outros papéis diferentes dos realizados pelo GnRH3. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar esta hipótese. Em relação aos receptores de GnRH, observam-se dois padrões de expressão, um compartilhado pelo *gnrhr1* e *gnrhr4* (constante ao longo dos estágios, com redução na vitelogênese intermediária), e outro para o *gnrhr2* e *gnrhr3* (constante ao longo dos estágios, com redução na pré-vitelogênese). Não se sabe o papel destes receptores no bulbo, assim como seu envolvimento ao longo dos estágios de maturação gonadal, no entanto, é provável que estejam envolvidos em diferentes funções.

3.1.3 Retina

Ao longo de todo o desenvolvimento ovariano, o *gnrh3* foi o ligante mais expresso na retina de fêmeas de zebrafish. Análises de imunohistoquímica demonstraram que o GnRH3 localiza-se em fibras da camada nuclear interna, fibras da camada plexiforme externa e também nas fibras das células ganglionares que formam o nervo óptico. Marcações similares têm sido descritas em outras espécies de teleósteos (Munz et al., 1982; Stell et al., 1984; Wirsig-Wiechmann e Wiechmann, 2002; Grens et al., 2005; Maruska e Tricas, 2007). Em relação aos receptores de GnRH, os resultados da RT-PCR e qPCR confirmam a presença dos quatro tipos de receptores na retina, conforme trabalho anterior (Tello et al., 2008). Dentre eles, o *gnrhr4* foi o receptor de maior expressão ao longo dos estágios de maturação ovariana, e também o único

detectado por hibridização *in situ*. Os sítios de expressão do *gnrhr4* na retina ocorrem nos núcleos das células amácrinas, bipolares e ganglionares. Interessantemente, tais sítios de expressão do *gnrhr4* ocorrem ao lado das fibras positivas de GnRH3. Esta interação entre as fibras de GnRH3 e as células amácrinas, bipolares e ganglionares também ocorre em outras espécies como *Astatotilapia burtoni* (Grens et al., 2005), *Chaetodon multicinctus*, *Thalassoma duperrey*, *Abudefduf abdominalis* e *Asterropteryx semipunctata* (Maruska e Tricas, 2007) e *Dicentrarchus labrax* (Servili et al., 2012).

A expressão do *gnrhr4* em diferentes tipos celulares da retina do zebrafish assim como a presença de fibras GnRH3 positivas sugerem que o papel neuromodulador do GnRH tenha dois efeitos importantes no processamento lateral e vertical da informação: 1) O GnRH3 que é liberado na camada nuclear interna e tem contato sináptico direto com as células interplexiformes e as células amácrinas, regulando o sistema dopaminérgico da retina envolvido nos processos de adaptação luminosa, regulação do movimento retino-motor (Donatti e Fanta, 2007) e detecção rápida de variações luminosas (Fernald, 2000). 2) O GnRH3 presente na camada das fibras do nervo óptico que está em contato direto com as células ganglionares modularia a informação que será transportada até o encéfalo (Foran et al., 1997; Grens et al., 2005).

Ao avaliar a expressão das moléculas do sistema GnRH/GnIH na retina, observa-se que os níveis de *gnrh2* e *gnrh3* não se alteram ao longo dos estágios de maturação, mas o *gnih* tem sua expressão diminuída no estágio de vitelogênese final. Não é conhecido o significado fisiológico destas observações, assim como o papel do GnIH na retina. Em relação aos receptores, o *gnrhr2* e *gnrhr3* mantêm seus níveis de expressão constantes ao longo dos estágios, enquanto que o *gnrhr1* e o *gnrhr4* têm sua expressão diminuída no estágio de pré-vitelogênese e vitelogênese tardia, respectivamente. Também não são compreendidas ainda estas alterações, mas é provável que estes receptores desempenhem diferentes funções fisiológicas na retina.

3.2 Ovário

Além de sua localização hipotalâmica, o sistema GnRH/GnIH também ocorre nos ovários de zebrafish, com destaque para os transcritos primários de *gnih*, *gnrh3* e dos receptores *gnrhr2* e *gnrhr3*, os quais tiveram maior expressão relativa ao longo do desenvolvimento ovariano. A localização extra-hipotalâmica do GnRH tem sido reportada em ovários de mamíferos através de estudos farmacológicos (Iwashita e Catt, 1985). Semelhantemente, o GnRH também tem sido encontrado nos ovários de várias espécies de peixes teleósteos, como goldfish (Pati e Habibi, 1998), *Anguilla japonica* (Okubo et al., 1999), medaka (Okubo et al., 2006), *Oncorhynchus mykiss* (Madigou et al., 2000), *Colisa lalia* (Ikemoto et al., 2003), *Tetraodon nigroviridis*

(Ikemoto e Park, 2005), entre outras. O presente estudo confirmou a expressão das duas formas de GnRH (*gnrh2* e *gnrh3*) no ovário de zebrafish, além de demonstrar que a proteína de GnRH3 se localiza especificamente no citoplasma dos oócitos perinucleolares, como reportado em *Heteropneustes fossilis* (Singh et al., 2007). Também foi observado RNAm dos receptores *gnrhr2* e *gnrhr4* nos oócitos perinucleares de zebrafish. A co-localização do GnRH e dos receptores *gnrhr2* e *gnrhr4* nestas células (oócitos perinucleolares) sugere um possível papel destas moléculas nos estágios iniciais da maturação ovariana de zebrafish. Interessantemente, à medida que os oócitos entram em vitelogênese, os níveis protéicos de GnRH e os níveis de RNAm dos receptores *gnrhr2* e *gnrhr4* diminuem e tornam-se indetectáveis nos estágios mais avançados da vitelogênese. Esta evidência também sugere uma importância da sinalização do GnRH/GnRHR2 e GnRHR3 nas etapas iniciais da vitelogênese. Também foram detectados transcritos primários de *gnrhr4* na zona radiata e nas células foliculares dos oócitos vitelogênicos de zebrafish. Estudos semelhantes também detectaram RNAm do GnRH e de seu receptor nas células da granulosa de humanos e de ratos (Cheng et al., 2002; Kang et al., 2003), assim como também foram evidenciados GnRH e seus receptores no ovário de goldfish (Pati e Habibi, 2000). Tal localização sugere possíveis interações funcionais destes genes na regulação do desenvolvimento folicular e/ou da atresia folicular.

Nos peixes, assim como em outras espécies de vertebrados, o GnRH regula o desenvolvimento folicular em dois níveis separados: na hipófise e no ovário (Pati e Habibi, 2000). O GnRH hipotalâmico exerce uma importante função hipofisiotrófica ao regular a secreção das gonadotropinas que posteriormente estimulam a esteroidogênese, vitelogênese e a gametogênese (Chen e Fernald, 2008; Shahjahan et al., 2014). Por outro lado o GnRH produzido localmente nas gônadas (Pati e Habibi, 1998) parece estar envolvido na regulação da esteroidogênese, apoptose, assim como também na manutenção da sincronia gonadal (Andreu-Vieyra e Habibi, 2000). De um modo geral são escassos os trabalhos que tentam elucidar o papel fisiológico do GnRH nos ovários de peixes teleósteos. Neste sentido, o presente trabalho também teve intuito de avaliar a expressão do *gnrh2* e o *gnrh3* ao longo dos estágios de maturação ovariana de zebrafish, no entanto, não foi possível encontrar diferenças significativas ao longo dos estágios de maturação avaliados, sugerindo que a expressão constante poderia manter uma síntese permanente de GnRH necessário para os diversos processos gonadais. Em contrapartida, em relação aos receptores, com exceção do *gnrhr1* que manteve-se estável, os níveis de RNAm dos outros (*gnrhr2*, *gnrhr3*, *gnrhr4*) diminuem significativamente ao longo da vitelogênese quando comparado com o crescimento primário. Estes resultados estão de acordo com os dados de hibridização *in situ* e

imunohistoquímica, confirmando o papel da sinalização do GnRH nas etapas iniciais, especificamente nos oócitos perinucleolares.

Neste trabalho, também reportamos de forma inédita a expressão de *gnih* ao longo dos estágios de maturação ovariana no zebrafish, assim como também localizamos seus sítios de expressão. O *gnih* tem seus níveis de expressão elevados nos ovários em crescimento primário, diminuindo significativamente com a maturação e vitelogênese. Os transcritos primários de *gnih* são encontrados nos oócitos em estágio de alvéolo cortical, especificamente nos grânulos corticais, e também nas células foliculares dos oócitos vitelogênicos. Interessantemente, com exceção da localização nas células foliculares dos oócitos vitelogênicos, a expressão do *gnih* não se sobrepõe com a localização da proteína do GnRH3; enquanto o GnRH3 ocorre nos oócitos perinucleolares e depois diminui nos oócitos de alvéolo cortical, o GnIH tem um padrão inverso de expressão. Este resultado poderia indicar uma ação dominante e supressiva de um ligante sobre o outro, assim como papéis diferentes em cada etapa do desenvolvimento oocitário. Outros estudos também descrevem a presença do GnIH e seu receptor nas gônadas de aves, mamíferos, reptéis e teleósteos (Bentley et al., 2008; Maddineni et al., 2008; Singh et al., 2008; Singh et al., 2011; Qi et al., 2013), embora as implicações funcionais da expressão do *gnih* e seu receptor *gnihR* são amplamente inexploradas nos teleósteos. Mais recentemente, estudos com camundongos tratados com GnIH demonstram que o GnIH inibiu o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese nos ovários dos camundongos, sugerindo papel regulatório deste neuropéptido nas funções ovarianas de camundongos (Singh et al., 2008). Esta observação pode suportar nossos resultados de expressão do *gnih* durante a maturação, onde o *gnih* diminui significativamente seus níveis com a maturação. No entanto, mais estudos fisiológicos são necessários para compreender a regulação do GnIH assim como seu papel biológico nas funções ovarianas de zebrafish.

5. Conclusões finais

O presente trabalho fornece um panorama de expressão do GnRH/GnIH e seus receptores no sistema olfato-bulbo-retinal de zebrafish, ilustrado na figura abaixo:

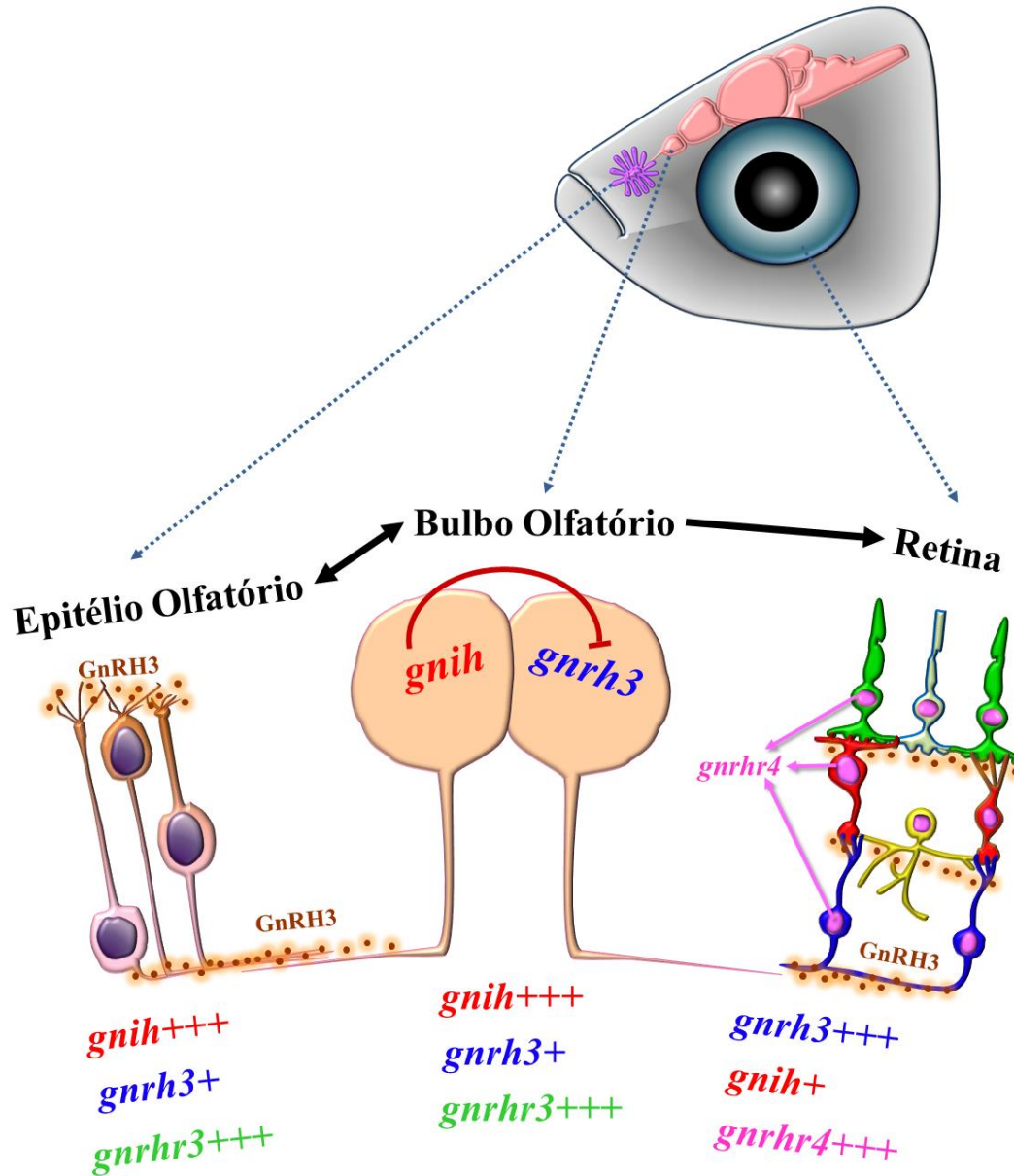


Figura 17. GnRH/GnIH e seus receptores no sistema olfato-bulbo-retinal de zebrafish. Destacando a presença de GnRH3 (●) na região apical do epitélio olfatório assim como em diferentes camadas da retina em contato com os fotorreceptores (verdes), células amácrinas (amarelo), bipolares (vermelho) e as células ganglionares (azul). Destacam-se também os genes mais expressos em cada tecido ao longo da maturação gonadal. No bulbo, existe uma relação inversa de expressão entre *gnih* e *gnrh3*, onde sugere-se que o *gnih* provavelmente suprime a expressão do *gnrh3*, como mostra a seta vermelha inibitória. Embaixo de cada tecido se destacam os genes que foram mais expressos ao longo da maturação gonadal. Fonte própria.

Com base nisso, pode-se concluir em cada órgão:

No epitélio olfatório:

- Fêmeas adultas de zebrafish expressam em seu epitélio olfatório todas as moléculas do sistema GnRH/GnIH (ligantes e receptores), demonstrando que o nervo terminal não é a única fonte de GnRH no epitélio olfatório;
- O *gnrh3* e os receptores de GnRH possuem expressão elevada no epitélio olfatório na fase final (vitelogênese tardia) quando comparadas com o início da vitelogênese (pré-vitelogênese). Estes dados sugerem que o epitélio poderia estar mais receptivo às moléculas de GnRH nos estágios finais de maturação gonadal, e o GnRH poderia ter uma função modulatória na informação sensorial relacionada à reprodução

No bulbo olfatório:

- Demonstra-se, de forma inédita, uma relação inversa entre a expressão de *gnih* e *gnrh3* no bulbo, onde o GnIH poderia inibir a expressão do *gnrh3*;
- Os níveis elevados de expressão do *gnrh2* no bulbo de fêmeas em vitelogênese tardia podem estar relacionados com o possível papel do GnRH2 no comportamento sexual das fêmeas e/ou estar envolvido em outros papéis diferentes dos realizados pelo GnRH3;

Na retina:

- Os sítios de expressão do *gnrhr4* na retina ocorrem nos núcleos das células amácrinas, bipolares e ganglionares, regiões estas onde também se encontram as fibras positivas de GnRH3. A presença destas moléculas na retina sugerem um papel neuromodulador do GnRH no processamento lateral e vertical da informação.
- Ao avaliar a expressão das moléculas do sistema GnRH/GnIH na retina, observa-se que os níveis de *gnrh2* e *gnrh3* não se alteram ao longo dos estágios de maturação, mas o *gnih* tem sua expressão diminuída no estágio de vitelogênese final. Não é conhecido o significado fisiológico destas observações, assim como o papel do GnIH na retina.

No ovário:

- O presente estudo confirmou a expressão das duas formas de GnRH (*gnrh2* e *gnrh3*) no ovário de zebrafish, além de demonstrar que a proteína de GnRH3 se localiza especificamente no citoplasma dos oócitos perinucleolares sugerindo um possível papel destas moléculas nos estágios iniciais da maturação ovariana.
- Interessantemente, à medida que os oócitos entram em vitelogênese, os níveis protéicos de GnRH e os níveis de RNAm dos receptores *gnrhr2* e *gnrhr4* diminuem, indicando uma importância da sinalização do GnRH/GnRHR2 e GnRHR3 nas etapas iniciais da vitelogênese.

- Os transcritos primários de *gnih* são encontrados nos oócitos em estágio de alvéolo cortical, especificamente nos grânulos corticais, e também nas células foliculares dos oócitos vitelogênicos. Interessantemente a expressão do *gnih* não se sobrepõe com a localização da proteína do GnRH3;

4 Referências

- Abe, H., Oka, Y., 2007. Neuromodulatory functions of terminal nerve-GnRH neurons. *Fish Physiology* 25, 455-503.
- Abraham, E., Palevitch, O., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2009. The zebrafish as a model system for forebrain GnRH neuronal development. *General and Comparative Endocrinology* 164, 151-160.
- Amano, M., Moriyama, S., Iigo, M., Kitamura, S., Amiya, N., Yamamori, K., Ukena, K., Tsutsui, K., 2006. Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon. *Journal of Endocrinology* 188, 417-423.
- Amano, M., Oka, Y., Yamanome, T., Okuzawa, K., Yamamori, K., 2002. Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri*. *Cell and Tissue Research* 309, 323-329.
- Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., Guillemin, R., 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44, 205-210.
- Andreu-Vieyra, C.V., Habibi, H.R., 2000. Factors controlling ovarian apoptosis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 78, 1003-1012.
- Baba, Y., Matsuo, H., Schally, A.V., 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44, 459-463.
- Barnett, D.K., Bunnell, T.M., Millar, R.P., Abbott, D.H., 2006. Gonadotropin-releasing hormone II stimulates female sexual behavior in marmoset monkeys. *Endocrinology* 147, 615-623.
- Bentley, G.E., Ubuka, T., McGuire, N.L., Chowdhury, V.S., Morita, Y., Yano, T., Hasunuma, I., Binns, M., Wingfield, J.C., Tsutsui, K., 2008. Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *General and Comparative Endocrinology* 156, 34-43.
- Bhatnagar, S., Vining, C., Iyer, V., Kinni, V., 2006. Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 18, 13-24.
- Biju, K.C., Gaikwad, A., Sarkar, S., Schreibman, M.P., Subhedar, N., 2005. Ontogeny of GnRH-like immunoreactive neuronal systems in the forebrain of the Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *General and Comparative Endocrinology* 141, 161-171.
- Biju, K.C., Singru, P.S., Schreibman, M.P., Subhedar, N., 2003. Reproduction phase-related expression of GnRH-like immunoreactivity in the olfactory to the olfactory bulb and in the receptor neurons, their projections nervus terminalis in the female Indian major carp *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *General and Comparative Endocrinology* 133, 358-367.
- Biran, J., Golan, M., Mizrahi, N., Ogawa, S., Parhar, I.S., Levavi-Sivan, B., 2014. LPXRf, the Piscine Ortholog of GnIH, and LPXRF Receptor Positively Regulate Gonadotropin Secretion in *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*). *Endocrinology* 155, 4391-4401.

- Breton, B., Motin, A., Kah, O., Lemenn, F., Geoffre, S., Precigoux, G., Chambolle, P, 1984. Homologous radioimmunoassay of a hypothalamic factor stimulating salmon pituitary gonadatropic function (sGnRH). *C R Acad. Sci. III* 299, 383–388.
- Clarke, I.J., Sari, I.P., Qi, Y., Smith, J.T., Parkington, H.C., Ubuka, T., Iqbal, J., Li, Q., Tilbrook, A., Morgan, K., Pawson, A.J., Tsutsui, K., Millar, R.P., Bentley, G.E., 2008. Potent Action of RFamide-Related Peptide-3 on Pituitary Gonadotropes Indicative of a Hypophysiotropic Role in the Negative Regulation of Gonadotropin Secretion. *Endocrinology* 149, 5811-5821.
- Chen, C.C., Fernald, R.D., 2008. GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *Journal of Fish Biology* 73, 1099-1120.
- Cheng, C.K., Yeung, C.M., Chow, B.K.C., Leung, P.C.K., 2002. Characterization of a new upstream GnRH receptor promoter in human ovarian granulosa-luteal cells. *Molecular Endocrinology* 16, 1552-1564.
- Donatti, L., Fanta, E., 2007. Retinomotor movements in the Antarctic fish *Trematomus newnesi* Boulenger submitted to different environmental light conditions. *Revista Brasileira de Zoologia* 24, 457-462.
- Eisthen, H.L., Delay, R.J., Wirsig-Wiechmann, C.R., Dionne, V.E., 2000. Neuromodulatory effects of gonadotropin releasing hormone on olfactory receptor neurons. *Journal of Neuroscience* 20, 3947-3955.
- Fernald, R., 2000. Sensory Systems, in: G, O. (Ed.), *The Laboratory Fish Handbook of experimental animals*. Elsevier, pp. 225-233.
- Foran, C.M., Myers, D.A., Bass, A.H., 1997. Modification of gonadotropin releasing hormone (GnRH) mRNA expression in the retinal-recipient thalamus. *General and Comparative Endocrinology* 106, 251-264.
- Gomes, C.C., Costa, F.G., Borella, M.I., 2013. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). *Micron* 52-53, 33-38.
- Grens, K.E., Greenwood, A.K., Fernald, R.D., 2005. Two visual processing pathways are targeted by gonadotropin-releasing hormone in the retina. *Brain Behavior and Evolution* 66, 1-9.
- Ikemoto, T., Oka, Y., Park, M.K., 2003. Existence of multiple isoforms of GnRH ligands and receptors in the dwarf gourami, *Colisa lalia*. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 41-42.
- Ikemoto, T., Park, M.K., 2005. Identification and molecular characterization of three GnRH ligands and five GnRH receptors in the spotted green pufferfish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 242, 67-79.
- Iwashita, M., Catt, K.J., 1985. Photoaffinity labeling of pituitary and gonadal receptors for gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 117, 738-746.
- Kang, S.K., Choi, K.C., Yang, H.S., Leung, P.C.K., 2003. Potential role of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II in the ovary and ovarian cancer. *Endocrine-Related Cancer* 10, 169-177.
- Kawai, T., Oka, Y., Eisthen, H., 2009. The Role of the Terminal Nerve and GnRH in Olfactory System Neuromodulation. *Zoological Science* 26, 669-680.
- Koda, A., Ukena, K., Teranishi, H., Ohta, S., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Tsutsui, K., 2002. A novel amphibian hypothalamic neuropeptide: Isolation, localization, and biological activity. *Endocrinology* 143, 411-419.
- Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., Silver, R., 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2410-2415.
- Lethimonier, C., Madigou, T., Munoz-Cueto, J.A., Lareyre, J.J., Kah, O., 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 135, 1-16.
- Levavi-Sivan, B., Avitan, A., 2005. Sequence analysis, endocrine regulation, and signal transduction of GnRH receptors in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 142, 67-73.

- Maaswinkel, H., Li, L., 2003. Olfactory input increases visual sensitivity in zebrafish: a possible function for the terminal nerve and dopaminergic interplexiform cells. *Journal of Experimental Biology* 206, 2201-2209.
- Maddineni, S.R., Ocon-Grove, O.M., Krzysik-Walker, S.M., Hendricks, G.L., III, Ramachandran, R., 2008. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) receptor gene is expressed in the chicken ovary: potential role of GnIH in follicular maturation. *Reproduction* 135, 267-274.
- Madigou, T., Mananos-Sanchez, E., Hulshof, S., Anglade, I., Zanuy, S., Kah, O., 2000. Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction* 63, 1857-1866.
- Maney, D.L., Richardson, R.D., Wingfield, J.C., 1997. Central administration of chicken gonadotropin-releasing hormone-II enhances courtship behavior in a female sparrow. *Hormones and Behavior* 32, 11-18.
- Maruska, K.P., Tricas, T.C., 2007. Gonadotropin-releasing hormone and receptor distributions in the visual processing regions of four coral reef fishes. *Brain Behavior and Evolution* 70, 40-56.
- Millar, R.P., 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science* 88, 5-28.
- Munz, H., Claas, B., Stumpf, W.E., Jennes, L., 1982. Centrifugal innervation of the retina by luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)-immunoreactive telencephalic neurons in teleostean fishes. *Cell and Tissue Research* 222, 313-323.
- Murakami, M., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Yasui, T., Irahara, M., Osugi, T., Tsutsui, K., 2008. Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *Journal of Endocrinology* 199, 105-112.
- Nobrega, R.H., Greebe, C.D., van de Kant, H., Bogerd, J., de Franca, L.R., Schulz, R.W., 2010. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. *Plos One* 5.
- Okubo, K., Sakai, F., Lau, E.L., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Naruse, K., Aida, K., Nagahama, Y., 2006. Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: Insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology* 147, 1076-1084.
- Okubo, K., Suetake, H., Aida, K., 1999. Expression of two gonadotropin-releasing hormone (GnRH) precursor genes in various tissues of the Japanese eel and evolution of GnRH. *Zoological Science* 16, 471-478.
- Onuma, T., Ando, H., Koide, N., Okada, H., Urano, A., 2005. Effects of salmon GnRH and sex steroid hormones on expression of genes encoding growth hormone/prolactin/somatolactin family hormones and a pituitary-specific transcription factor in masu salmon pituitary cells in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 143, 129-141.
- Parhar, I., Ogawa, S., Kitahashi, T., 2012. RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Progress in Neurobiology* 98, 176-196.
- Parhar, I.S., Iwata, M., 1994. Gonadotropin-releasing-hormone (gnrh) neurons project to growth-hormone and somatolactin cells in the steelhead trout. *Histochemistry* 102, 195-203.
- Pati, D., Habibi, A.R., 1998. Presence of Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) and Compounds with GnRH-Like Activity in the Ovary of Goldfish. *Endocrinology* 139, 2015-2024.
- Pati, D., Habibi, H.R., 2000. Direct action of GnRH variants on goldfish oocyte meiosis and follicular steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 160, 75-88.
- Qi, X., Zhou, W., Lu, D., Wang, Q., Zhang, H., Li, S., Liu, X., Zhang, Y., Lin, H., 2013. Sexual Dimorphism of Steroidogenesis Regulated by GnIH in the Goldfish, *Carassius auratus*. *Biology of Reproduction* 88.
- Sawada, K., Ukena, K., Satake, H., Iwakoshi, E., Minakata, H., Tsutsui, K., 2002. Novel fish hypothalamic neuropeptide - Cloning of a cDNA encoding the precursor polypeptide and identification and localization of the mature peptide. *European Journal of Biochemistry* 269, 6000-6008.

- Schild, D., Restrepo, D., 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiological Reviews* 78, 429-466.
- Servili, A., Herrera-Perez, P., Kah, O., Antonio Munoz-Cueto, J., 2012. The retina is a target for GnRH-3 system in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *General and Comparative Endocrinology* 175, 398-406.
- Shahjahan, M., Kitahashi, T., Parhar, I.S., 2014. Central Pathways Integrating Metabolism and Reproduction in Teleosts. *Frontiers in Endocrinology* 5, 1-17.
- Sherwood, N.M., Schalburg, K.V., Lescheid, D., 1997. Origin and evolution of GnRH in vertebrates and invertebrates, in: Parhar, I.S., Y, S. (Eds.), *GnRH Neurons: Gene to Behavior*. Brain Shuppan, pp. 3-25.
- Singh, P., Krishna, A., Sridaran, R., 2007. Localization of gonadotrophin-releasing hormone I, bradykinin and their receptors in the ovaries of non-mammalian vertebrates. *Reproduction* 133, 969-981.
- Singh, P., Krishna, A., Sridaran, R., Tsutsui, K., 2008. Changes in GnRH I, bradykinin and their receptors and GnIH in the ovary of *Calotes versicolor* during reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 159, 158-169.
- Singh, P., Krishna, A., Tsutsui, K., 2011. Effects of gonadotropin-inhibitory hormone on folliculogenesis and steroidogenesis of cyclic mice. *Fertility and Sterility* 95, 1397-1404.
- Stell, W.K., Walker, S.E., Chohan, K.S., Ball, A.K., 1984. The goldfish *nervus terminalis*: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81, 940-944.
- Stephenson, J.F., Partridge, J.C., Whitlock, K.E., 2012. Food and Conspecific Chemical Cues Modify Visual Behavior of Zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* 9, 68-73.
- Subhedar, N., Krishna, N.S.R., 1988. Immunocytochemical localization of LH-RH in the brain and pituitary of the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *General and Comparative Endocrinology* 72, 431-442.
- Tello, J.A., Wu, S., Rivier, J.E., Sherwood, N.M., 2008. Four functional GnRH receptors in zebrafish: analysis of structure, signaling, synteny and phylogeny. *Integrative and Comparative Biology* 48, 570-587.
- Terasawa, E., Busser, B.W., Luchansky, L.L., Sherwood, N.M., Jennes, L., Millar, R.P., Glucksman, M.J., Roberts, J.L., 2001. Presence of luteinizing hormone-releasing hormone fragments in the rhesus monkey forebrain. *Journal of Comparative Neurology* 439, 491-504.
- Thisse, C., Thisse, B., 2008. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature Protocols* 3, 59-69.
- Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., Sharp, J.P., 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275, 661-667.
- Tsutsui, K., Ubuka, T., Bentley, G.E., Kriegsfeld, L.J., 2012. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Discovery, progress and prospect. *General and Comparative Endocrinology* 177, 305-314.
- Ubuka, T., Kim, S., Huang, Y.C., Reid, J., Jiang, J., Osugi, T., Chowdhury, V.S., Tsutsui, K., Bentley, G.E., 2008. Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain. *Endocrinology* 149, 268-278.
- Ubuka, T., Morgan, K., Pawson, A.J., Osugi, T., Chowdhury, V.S., Minakata, H., Tsutsui, K., Millar, R.P., Bentley, G.E., 2009. Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *Plos One* 4, e80400.
- Ubuka, T., Ukena, K., Sharp, P.J., Bentley, G.E., Tsutsui, K., 2006. Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology* 147, 1187-1194.

- Ukena, K., Koda, A., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Iwakoshi-Ukena, E., Minakata, H., Kikuyama, S., Tsutsui, K., 2003. Novel neuropeptides related to frog growth hormone-releasing peptide: Isolation, sequence, and functional analysis. *Endocrinology* 144, 3879-3884.
- Volkoff, H., Peter, R.E., 1999. Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 116, 347-355.
- Wang, Y., Ge, W., 2004. Developmental profiles of activin beta A, beta B, and follistatin expression in the zebrafish ovary: Evidence for their differential roles during sexual maturation and ovulatory cycle. *Biology of Reproduction* 71, 2056-2064.
- White, R.B., Fernald, R.D., 1998. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species. *General and Comparative Endocrinology* 112, 17-25.
- Wirsig-Wiechmann, C.R., Jennes, L., 1993. Gonadotropin-Releasing-Hormone agonist binding in tiger salamander nasal cavity. *Neuroscience Letters* 160, 201-204.
- Wirsig-Wiechmann, C.R., Wiechmann, A.F., 2002. Vole retina is a target for gonadotropin-releasing hormone. *Brain Research* 950, 210-217.
- Xia, W., Smith, O., Zmora, N., Xu, S., Zohar, Y., 2014. Comprehensive Analysis of GnRH2 Neuronal Projections in Zebrafish. *Sci. Rep.* 4.
- Yamamoto, N., Ito, H., 2000. Afferent sources to the ganglion of the terminal nerve in teleosts. *Journal of Comparative Neurology* 428, 355-375.
- Yamamoto, N., Oka, Y., Amano, M., Aida, K., Hasegawa, Y., Kawashima, S., 1995. Multiple Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH)-immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia* - immunohistochemistry and radioimmunoassay. *Journal of Comparative Neurology* 355, 354-368.
- Yamamoto, N., Oka, Y., Kawashima, S., 1997. Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: Effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. *Neuroendocrinology* 65, 403-412.
- Zhang, W., Delay, R.J., 2007. Gonadotropin-releasing hormone modulates voltage-activated sodium current and odor responses in *Necturus maculosus* olfactory sensory neurons. *Journal of Neuroscience Research* 85, 1656-1667.

ANEXO I

GnRH/GnIH e seus receptores no testículo de zebrafish

Imunomarcacão do GnRH3 no testículo

O testículo de zebrafish apresentou imunorreatividade para o GnRH3 principalmente nas células de Sertoli, nas células de Leydig e nas gerações espermatogoniais na presença dos dois anticorpos testados (Figuras 1A,C,D). É possível observar marcação ao redor dos cistos, correspondente ao citoplasma das células de Sertoli (Fig. 1C). O padrão de imunorreação do GnRH3 nos testículos utilizando GF6 ou BB8 é o mesmo, no entanto, a mesma é mais intensa com BB8 (Figuras 1C,D).

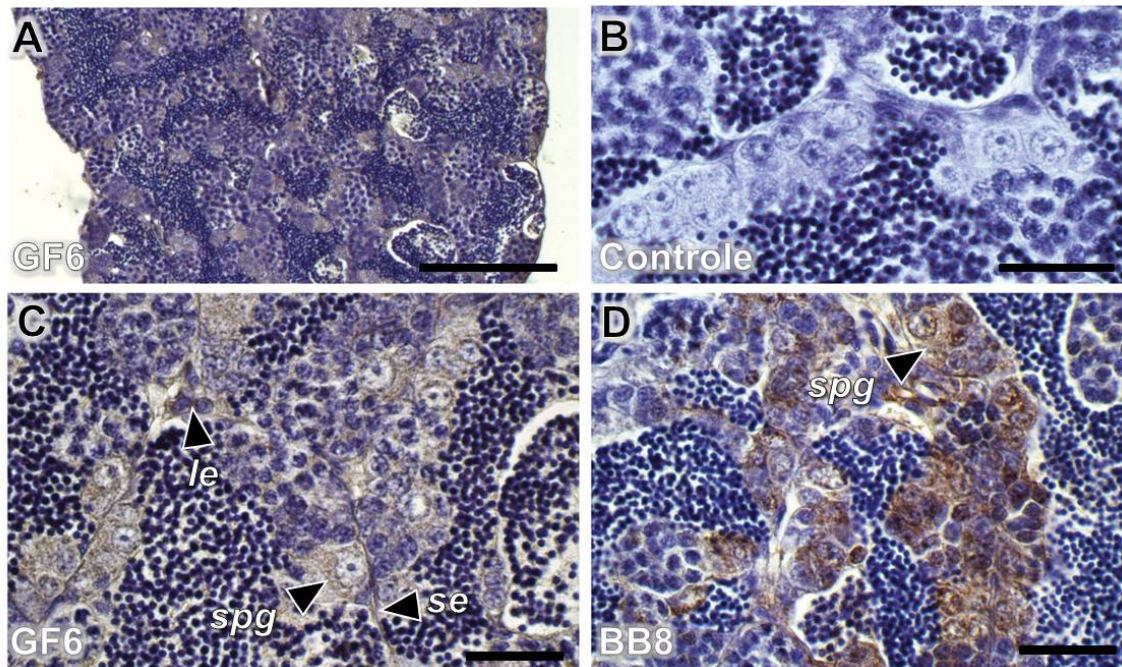


Figura 1. Imunodeteccão do GnRH3 no testículo de zebrafish. (A) Corte histológico de um testículo de zebrafish, mostrando ampla imunorreatividade ao GnRH3. (B) Controle negativo (omissão do anticorpo primário ou anticorpo neutralizado com seu peptídeo sintético alvo). (C) Imunomarcacão do GnRH3 utilizando o anticorpo GF6. Notar imunorreatividade do GnRH3 nas células de Leydig (le), no citoplasma das Sertoli (se) e nas gerações espermatogônias (spg). (D) Imunomarcacão do GnRH3 utilizando o anticorpo BB8; notar intensa imunorreatividade no citoplasma das diferentes gerações espermatogoniais (spg). Barras: A= 100 μ m; B, C, D= 25 μ m.

Expressão do *gnih*, *gnrhr2* e *gnrhr4* no testículo do zebrafish

Para os testículos de zebrafish, os únicos transcritos primários que puderam ser detectados por ISH foram do *gnih*, *gnrhr1* e *gnrhr4*. A expressão do *gnih* é bastante ampla no testículo, ocorrendo em todas as células germinativas, principalmente nas espermatogônias (Figuras 2B,C). Também é possível encontrar expressão do *gnih* no compartimento intersticial (Figuras 2B,C). O *gnrhr1* foi observado em células germinativas em diferentes estágios da espermatogênese (Figura 2D). Por fim, o *gnrhr4* se expressa fortemente no núcleo das espermatogônias, e sua expressão diminui nas outras células germinativas, não sabendo-se ao certo se o RNAm se localiza na periferia das células germinativas ou nas células de Sertoli (Figuras 2E,F).

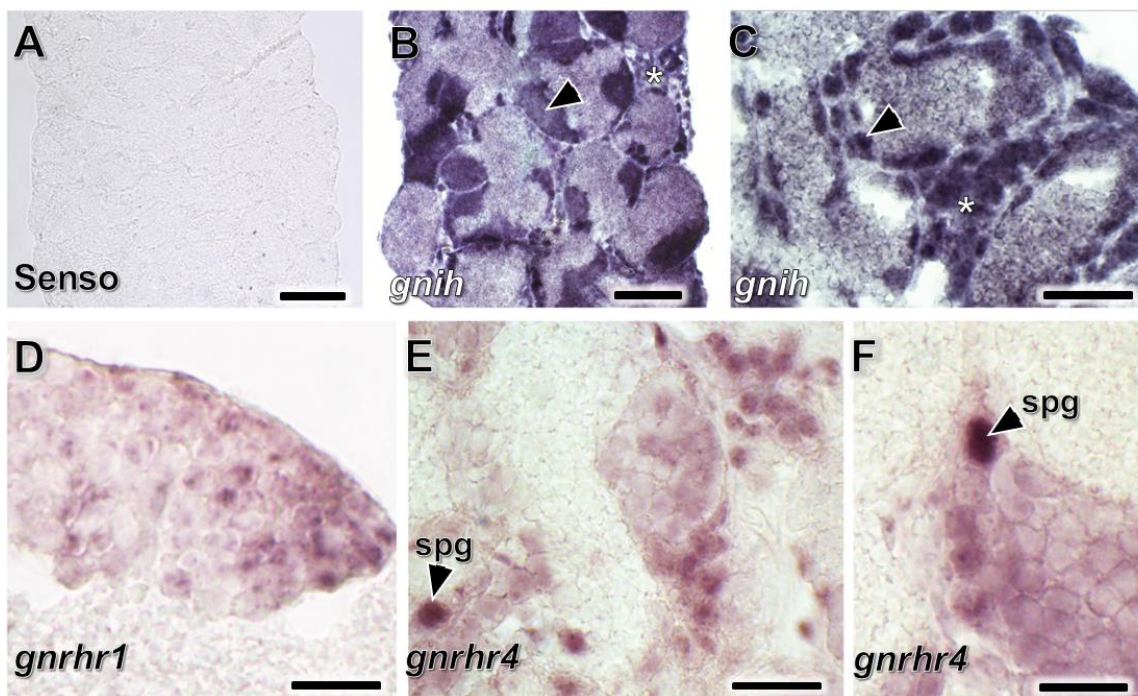


Figura 2. Expressão do *gnih*, *gnrhr2* e *gnrhr4*-RNAm no testículo do zebrafish. (A) Controle negativo obtido incubando os tecidos com a sonda senso. (B) Marcação do *gnih* nas células germinativas em diferentes estágios, assim como compartimento intersticial (asterisco). (C) Detalhe da forte marcação do *gnih* nas espermatogônias e no compartimento intersticial (asterisco). (D) Marcação do *gnrhr1* nas células germinativas. (E,F) Expressão do *gnrhr4* nas espermatogônias (spg), e outras células germinativas. Barras: A,B= 100 μ m; C= 25 μ m; D,E= 15 μ m; F= 20 μ m.

Expressão do *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih*, *gnrhr1*, 2, 3 e 4 no testículo

Os testículos não foram classificados, pois os machos de zebrafish apresentam espermatogênese contínua. Os transcritos primários de *gnrh2*, *gnrh3* e *gnih* não se alteraram nos indivíduos analisados (Figura 3). Em relação aos receptores, destacam-se os níveis de RNAm do *gnrhr3* significativamente mais altos quando comparado com os outros receptores (Figura 3).

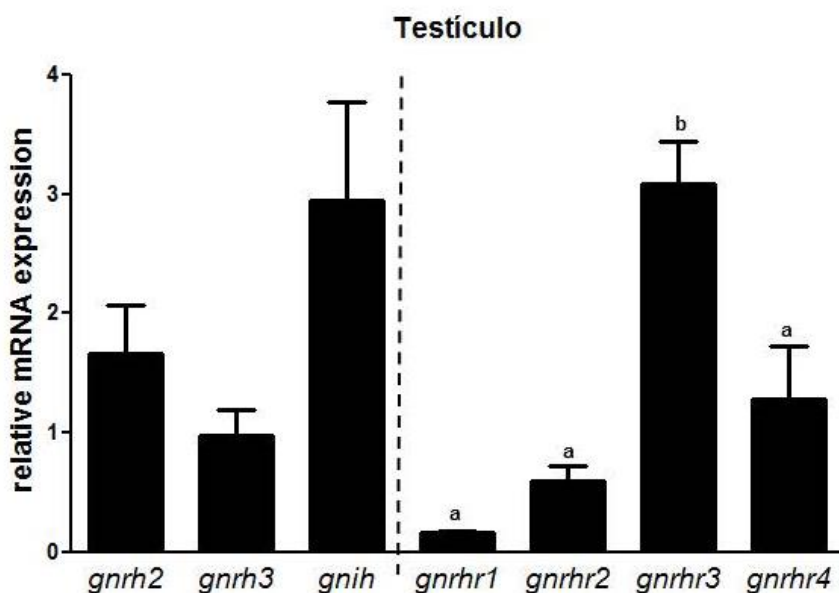


Figura 3. Expressão dos *gnrh2*, *gnrh3*, *gnih* e os receptores *gnrhr1,2,3,4* no testículo zebrafish. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os estágios.

Discussão

Os testículos de zebrafish expressam todos os ligantes e receptores do sistema GnRH/GnIH. Dentre os ligantes, não há uma expressão diferencial entre eles, apesar da variação individual em função da impossibilidade de estagiar os testículos e das possíveis diferenças na composição testicular. Para os receptores, destaca-se o *gnrhr3* que teve maior expressão dentre os receptores. A proteína do GnRH3 foi detectada principalmente em células de Sertoli, células de Leydig e também nas diferentes gerações espermatogoniais, principalmente em espermatogônias indiferenciadas. Estes resultados confirmam estudos anteriores que mostram a localização intersticial do *gnrh3* no testículo de zebrafish (Kuo et al., 2005). Em relação aos receptores, observa-se que os transcritos primários do *gnrhr1* e *gnrhr4* são encontrados nas células germinativas (principalmente nas gerações espermatogoniais), assim como também, possivelmente nas células de Sertoli. A localização do GnRH3 e dos receptores sugere

envolvimento destas moléculas nas etapas iniciais da espermatogênese (fase espermatogonial). Ao comparar os sítios de localização entre machos e fêmeas, é possível que o GnRH desempenhe um papel nas etapas iniciais da gametogênese. Mais estudos são necessários para avaliar o papel do GnRH tanto na espermatogênese como na oogênese de zebrafish. Também mostramos neste trabalho a expressão testicular do *gnih*. Os transcritos primários de *gnih* também têm sido detectados em testículos de diferentes vertebrados (Tsutsui, 2009). No testículo da codorna japonesa *Coturnix japonica* foi identificada intensa expressão do *gnih* e seu receptor nas células intersticiais e germinativas (Bentley et al., 2008). Assim como nas codornas, o testículo de hamster apresentou uma forte marcação do *gnih* e seu receptor nos túbulos seminíferos, especificamente nos espermatócitos e nas espermatídes, pelo qual sugere-se que o gene pode estar envolvido na regulação da espermatogênese (Zhao et al., 2010). Em macacos, o *gnih* encontra-se expresso nas células de Leydig, células de Sertoli, nas espermatogônias e nos espermatócitos (McGuire e Bentley, 2010). Nossos resultados de hibridização *in situ* mostram que os transcritos primários de *gnih* encontram-se intensamente e amplamente expressos nos diferentes tipos de células germinativas, assim como também em células intersticiais. A presença tanto do GnRH3, do GnIH, e de seus receptores nas células germinativas, nas células de Sertoli e células de Leydig de zebrafish sugere que o sistema GnRH/GnIH poderia estar envolvido na regulação da esteroidogênese e/ou a espermatogênese.

Referências

Bentley, G.E., Ubuka, T., McGuire, N.L., Chowdhury, V.S., Morita, Y., Yano, T., Hasunuma, I., Binns, M., Wingfield, J.C., Tsutsui, K., 2008. Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *General and Comparative Endocrinology* 156, 34-43.

Kuo, M.W., Lou, S.W., Postlethwait, J., Chung, B.C., 2005. Chromosomal organization, evolutionary relationship, and expression of zebrafish GnRH family members. *Journal of Biomedical Science* 12, 629-639.

McGuire, N.L., Bentley, G.E., 2010. Neuropeptides in the gonads: from evolution to pharmacology. *Frontiers in Pharmacology* 1.

Tsutsui, K., 2009. A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Progress in Neurobiology* 88, 76-88.

Zhao, S., Zhu, E., Yang, C., Bentley, G.E., Tsutsui, K., Kriegsfeld, L.J., 2010. RFamide-Related Peptide and Messenger Ribonucleic Acid Expression in Mammalian Testis: Association with the Spermatogenic Cycle. *Endocrinology* 151, 617-627.