LÁZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS

**GONADOTROPINAS E SEUS RECEPTORES
EM *Astyanax altiparanae* (TELEOSTEI, CHARACIFORMES):
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO
ESPAÇO-TEMPORAL DURANTE O CICLO
REPRODUTIVO EM CATIVEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo
2016**

LÁZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS

**GONADOTROPINAS E SEUS RECEPTORES
EM *Astyanax altiparanae* (TELEOSTEI, CHARACIFORMES):
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO
ESPAÇO-TEMPORAL DURANTE O CICLO
REPRODUTIVO EM CATIVEIRO**

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

Versão Original

**São Paulo
2016**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Jesus, Lázaro Wender Oliveira de.

Gonadotropinas e seus receptores em *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characiformes): caracterização molecular e expressão espaço-temporal durante o ciclo reprodutivo em cativeiro / Lázaro Wender Oliveira de Jesus. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Maria Inês Borella.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Endocrinologia de peixes.

Versão do título para o inglês: Gonadotropins and their receptors in *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characiformes): molecular characterization and spatio-temporal expression during the reproductive cycle in captivity.

1. Peixes 2. Lambari 3. Reprodução 4. Hipófise 5. Gônadas caracterização molecular e expressão espaço-temporal durante o ciclo reprodutivo em cativeiro 6. Hormônios I. Borella, Maria Inês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB073/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lázaro Wender Oliveira de Jesus.

Título da Tese: Gonadotropinas e seus receptores em *Astyanax altiparanae*
(Teleostei, Characiformes): caracterização molecular e
expressão espaço-temporal durante o ciclo reprodutivo em
cativeiro.

Orientador(a): Maria Inês Borella.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **130** nas fls. **110** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria Inês Borella**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Clonagem molecular e expressão dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), dinâmica das células gonadotróficas e esteróides sexuais durante a ontogenia e ciclo reprodutivo do Characiforme Astyanaxaltiparanae Garutti e Britski 2000*" do qual participam o(s) aluno(s) **Lázaro Wender Oliveira de Jesus**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **10.10.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 13 de outubro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 074.14

São Paulo, 08 de outubro de 2014.

REF.: Protocolo nº 13011.

" Clonagem molecular e expressão dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), dinâmica das células gonadotrópicas e esteróides sexuais durante a ontogenia e ciclo reprodutivo do Characiforme Astyanaxaltiparanae Garutti e Britski 2000".

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até 10.10.2017.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo^(a). Sr^(a).

Prof^(a). Dr^(a). Maria Inês Borella

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico este trabalho à minha querida avó,
Evangelha Diolina de Oliveira Rodrigues (*in memoriam*),
pelo carinho, respeito, ensinamentos e exemplo de
atitude positiva frente às diversidades.

Minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar meus caminhos e conceder forças para eu vencer as incertezas e desafios da carreira acadêmica. E ainda, por me proporcionar experiências incríveis e conhecer pessoas admiráveis durante toda essa jornada na USP de São Paulo e na Holanda.

À minha família, especialmente aos meus pais, Célia Aparecida e Waesso Orcélio de Oliveira, bem como minha avó materna, Evangelha Oliveira, por serem o alicerce da minha formação pessoal, moral e apoiar incondicionalmente minhas aspirações profissionais.

Aos meus amigos de longa data, Paulo Roberto, Bárbara Rauber, Ísis Braga, Valéria Ferreira, Thiago Batista e Estael Lima, pela amizade incondicional.

Aos amigos, Dra. Lorena Rezende (UFMT), Dr. Fernando Ladd (UFRN) e Dra. Alliny Ladd (FMVZ-USP). Vocês contribuíram muito para o início da minha carreira acadêmica na USP. Sempre serei grato por todos os conselhos e ajuda nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Dra. Maria Inês Borella, pelos conhecimentos compartilhados, confiança depositada e pelas muitas oportunidades a mim dadas, para a realização do mestrado, doutorado e do Doutorado Sanduíche na Holanda. Ainda, agradeço por apoiar e incentivar minhas escolhas profissionais.

A todos componentes do Laboratório de Endocrinologia de Peixes, atuais (Gisele Melo, Marília Paiva, Mônica Cassel e Telma Monezi) e que já nos deixaram (Giovana Branco, Chayrra Gomes, Mateus Adolfi, Sara Gomes e Fabiano Costa), pelos diversos momentos científicos e pessoais compartilhados. E também à Rejane Funes, minha primeira aluna de Iniciação Científica, pelo aprendizado e experiências.

Ao Cruz Alberto Mendonza Rigonati, técnico do nosso laboratório, pelo apoio em todas as etapas deste trabalho, durante as inúmeras viagens à CESP de Paraibuna, pelos cortes histológicos primorosos e, ainda, pela amizade e confiança ao longo desses anos.

A todos docentes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelos ensinamentos e ambiente científico profícuo proporcionado.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, pela busca incessante de aperfeiçoamento e fortalecimento deste programa e pela atenção dada aos seus pós-graduandos.

À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, Regina Valbom, por todos os serviços prestados, sempre com muita presteza e paciência.

À Profa. Dra. Irene Yan (ICB-USP) e seu ex-aluno, Dr. Felipe Vieceli, pela colaboração desenvolvida nas etapas iniciais deste trabalho e ainda por guiar meus primeiros passos no “Universo” da Biologia Molecular.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia Molecular dos Vertebrados (ICB – USP), Tatiane Kanno, Maraysa Melo e Carolina Purcell, pela convivência, descontração e ajuda durante as inúmeras reações de cDNA, RT-PCR e clonagem molecular realizadas nesse trabalho.

À Doutoranda e colega Renata Gomes pelo auxílio na técnica de Western Blott. E a Profa. Dra. Alison Colquhoun (ICB – USP) por ceder seu laboratório e reagentes para o desenvolvimento desta técnica.

À Dra. Daniela Ogias (ICB – USP) pelo auxílio nas análises de qPCR.

Às Dras. Patrícia Gama, Dra. Telma Zorn e Dra. Marilene Lopes (ICB – USP) pela gentil disponibilização de equipamentos de seus laboratórios.

Aos técnicos de Laboratório do ICB – USP Emília Ribeiro, Marco Aurélio, Marley Januário e Gabriela Malheiros por todas as facilidades concedidas.

Aos colegas da Comissão Organizadora do I Curso de Verão em Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB - USP, Prof. Dr. Fábio Siviero, Dr. Rodolfo Favaro, Dra. Tatiane Donato, Dra. Heloíza Rezende e Dr. Felipe Vieceli. Nós idealizamos, aprendemos, erramos, mas acima de tudo, crescemos muito com a realização deste evento. Nossa sementinha cresceu e hoje já se encontra na quinta edição.

Ao Prof. Dr. Jan Bogerd, do Reproductive Biology Group, Faculty of Sciences, Utrecht University, Holanda, pela oportunidade de realizar parte do meu doutorado em seu laboratório. Foi uma experiência ímpar trabalhar em um grupo de pesquisa reconhecido internacionalmente na área de Endocrinologia de Peixes. Ainda, pude aprender novas metodologias bem como aperfeiçoar meus conhecimentos na área de Biologia Molecular.

Aos demais componentes do Reproductive Biology Group, Faculty of Sciences, Utrecht University, Dr. Rüdiger Schulz, Henk van de Kant, Diego Crespo, Roberto Morais, Luiz Henrique, Michelle Mello e Diego Safian, por todos os momentos científicos e de descontração.

Ao grande amigo Dr. Rafael Henrique Nóbrega (IBB-UNESP), por toda receptividade durante minha chegada à cidade de Utrecht, bem como pela amizade, experiências e

conhecimentos compartilhados durante minha estada na Holanda. Ainda, pelas colaborações científicas atuais e que virão.

À banca avaliadora do exame de qualificação, Dr. Fábio Siviero (ICB-USP), Dra. Renata Guimarães Moreira (IB – USP) e Dr. Emanuel Ricardo Martinez (IBB-UNESP, Botucatu), pelas considerações feitas para melhoria deste trabalho.

À Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira, do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) do IB - USP, por todas as ideias e experiências compartilhadas para o aperfeiçoamento deste trabalho, bem como pelo auxílio nas dosagens dos esteroides sexuais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o início do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento (n. 477187/2011-0) da parte inicial deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas, de Doutorado (n. 2011/19268-8) e de Estágio em Pesquisa no Exterior (2013/18297-0). Ainda, pelo auxílio à pesquisa que permitiu a conclusão deste trabalho (2014/23451-0).

À Estação de Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP) de Paraibuna, pelo fornecimento de todos os espécimes utilizados e pela manutenção de um lote de lambaris por quase dois anos, exclusivamente pra esse estudo. Ainda, de forma especial ao Biólogo Danilo Canepelle e aos funcionários Diego, Milton e Edimur, que não mediram esforços para facilitar o nosso trabalho durante as muitas coletas realizadas.

Ao Setor de Transporte do ICB-USP, pela disponibilidade de carro e motorista para as inúmeras coletas realizadas na cidade de Paraibuna.

A todos os lambaris utilizados neste estudo, os quais foram manipulados e utilizados seguindo os Princípios Éticos de Experimentação Animal.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de uma forma ou outra para este trabalho, o meu MUITO OBRIGADO!

*Minha energia é o desafio,
minha motivação é o impossível,
e é por isso que eu preciso
ser, à força e a esmo, inabalável.*

Augusto Branco

RESUMO

JESUS, L. W. O. **Gonadotropinas e seus receptores em *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characiformes): caracterização molecular e expressão espaço-temporal durante o ciclo reprodutivo em cativeiro.** 2016. 148 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Visando compreender melhor a regulação endócrina da reprodução em espécies da ordem Characiformes e as bases fisiológicas das disfunções reprodutivas que comumente ocorre em espécies migradoras quando em cativeiro, nós escolhemos como modelo deste estudo *Astyanax altiparanae*. Inicialmente, a partir da hipófise, foram clonados e caracterizados os cDNAs completos para as subunidades beta dos hormônios folículo-estimulante (*fshb*), luteinizante (*lhb*) e da subunidade alfa das gonadotropinas (*gpha*). Das gônadas, foram clonados e caracterizados os cDNAs para os receptores de gonadotropinas (*fshr* e *lhr*). As análises filogenéticas destes genes demonstram uma proximidade com aquelas homólogas das ordens Siluriformes e Cypriniformes. A seguir, por meio de qPCR, detectamos que a expressão dos mRNAs para as gonadotropinas foi restrita à hipófise, ao passo que dos receptores foi restrita às gônadas. As técnicas de hibridização *in situ* e imunofluorescência dupla, utilizando-se anticorpos policlonais específicos, mostraram que os mRNAs/proteínas para subunidades beta são expressas por diferentes populações de células gonadotrópicas na hipófise. Nas gônadas, o Fshr e Lhr foram imunodetectados nas células de Sertoli e Leydig, bem como nas células foliculares e da teca a partir de oócitos perinucleolares. Então, os níveis de expressão gênica de *gpha*, *fshb*, *lhb*, *fshr* e *lhr*, juntamente como os níveis plasmáticos de esteroides sexuais foram avaliados e relacionados com a cinética da gametogênese durante o ciclo reprodutivo anual de machos e fêmeas em cativeiro. Nas fêmeas, os níveis de *fshb* alteraram significativamente ao longo do ciclo reprodutivo, embora os níveis plasmáticos de E₂ não apresentaram alterações. Já os níveis de *lhb* e 17α, 20β-DHP foram constantes durante todo o ciclo reprodutivo, possivelmente sendo a causa das disfunções reprodutivas apresentadas pelas fêmeas em cativeiro. Altos níveis de *fshr* foram detectados nos ovários durante a maior parte do ciclo, ao passo que os níveis de *lhr* apresentaram um aumento a partir do início da estação reprodutiva, apresentando um pico em janeiro de 2012, em paralelo ao pico de IGS. Nos machos, foi observado um aumento de *fshb* de setembro de 2012 a janeiro de 2013, com posterior redução destes níveis. Já os níveis de *lhb* estavam elevados em setembro de 2012 e a seguir apresentaram uma redução progressiva. Nos testículos, os níveis de ambos os receptores apresentaram-se constantes

durante a maior parte do ciclo reprodutivo. Os níveis plasmáticos de T e 11-kt apresentaram a mesma cinética, embora os níveis de 11-kt eram cerca de 10 vezes mais altos que os de T. Em setembro de 2012, ambos os andrógenos estavam reduzidos, mas em novembro de 2012 apresentaram um pico, exibindo uma redução progressiva nos demais meses. Entretanto, o IGS nos machos apresentou-se constante durante a maior parte do ciclo, exibindo apenas uma redução em maio de 2013. Em conjunto, estes dados ampliam os dados sobre a regulação endócrina da reprodução em Characiformes, bem como podem ser utilizados em futuros estudos básicos e aplicados à aquicultura.

Palavras chave: Peixes. Lambari. Reprodução. Hipófise. Gônadas. Hormônios.

ABSTRACT

JESUS, L. W. O. **Gonadotropins and their receptors in *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characiformes): molecular characterization and spatio-temporal expression during the reproductive cycle in captivity.** 2016. 148 p. Ph. D. Thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

To better understand the endocrine control of reproduction in Characiformes and the basis from reproductive dysfunctions that commonly occur in migratory fish when kept in captivity, we chose *Astyanax altiparanae* as model species. First, from pituitary, we cloned the full-length cDNAs coding for the follicle-stimulating hormone beta subunit (*fshb*), the luteinizing hormone beta subunit (*lhb*), and the common gonadotropin alpha subunit (*gpha*). From gonads, we cloned the full-length cDNAs for gonadotropin receptors (*fshr* and *lhr*). Phylogenetic analysis revealed that all five sequences showed the highest degree of amino acid identity with other homologous sequences from Siluriformes and Cypriniformes, respectively. Next, using qPCR, we observed that gonadotropin subunits expression was restricted to the pituitary gland, just like their receptors expression was restricted to the gonads. In addition, *in situ* hybridization and double immunofluorescence technique, employed with specific polyclonal antibodies, revealed that both gonadotropin beta subunits mRNAs/proteins are expressed by distinct populations of gonadotropes at pituitary. Both *Fshr* and *Lhr* were immunodetected on Sertoli and Leydig cells, as well as on ovaries on follicular and theca cells, starting from perinucleolar oocytes. Then, gene expression levels of *gpha*, *fshb*, *lhb*, *fshr* e *lhr*, in parallel to plasma level of sex steroids, were assessed and evaluated according to gametogenesis during the annual reproductive cycle of males and females kept in captivity. In females, the *fshb* transcript levels changed significantly throughout the cycle, although the E₂ plasma levels did not. The *lhb* transcripts and 17 α , 20 β -DHP plasma were constant over the time, and possibly, this must be related to the reproductive impairment of *A. altiparanae* females in captivity. High *fshr* levels were observed in ovaries during most of the cycle, whereas *lhr* levels showed an increase from the beginning of the spawning season, presenting a peak in January 2012, in parallel to the GSI peak. In males, a progressive increasing of *fshb* transcripts was noted from September 2012 to January 2013, and subsequent reduction of these levels. However, *lhb* transcript levels were elevated in September 2012, but after that showed a progressive reduction. In the testes, both gonadotropin receptors were constant during the most part of the cycle. T and 11-kT plasma levels showed the same patterns, besides 11-kT levels were around 10 times higher than T levels. In September 2013, both androgens were reduced, but displayed a pick

in November 2012, and next, a progressive reduction from both was observed. In males, GSI was constant in most part of the cycle, showing only one reduction in May 2013. Taken together, these data clarified the endocrine regulation of reproduction in Characiformes, and can be used as base in further basic and applied studies related to Aquaculture.

Keywords: Fish. Lambari. Reproduction. Pituitary gland. Gonad. Hormones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Secções sagitais da hipófise de *A. altiparanae* coradas por Tricômico de Mallory (A, B) e pelo Ácido periódico – Reativo de Schiff (PAS) (C). Observe as três regiões adeno-hipofisárias (A, C), rostral pars distalis (RPD), proximal pars distalis (RPD) e pars intermedia (PI) e as ramificações da neuro-hipófise (asteriscos). Em (B), um detalhe da PPD evidenciando as células gonadotrópicas intensamente cianófilas e com vacúolos citoplasmáticos (setas). Em (C) note a positividade das células gonadotrópicas ao PAS. Escala: 100 µm (A, C), 20 µm (B). 33
- Figura 2** – Esquema da organização dos receptores de gonadotropinas. A região N-terminal compreende o domínio extracelular (ETC), o qual apresenta dez cadeias beta-pregueadas. O domínio transmembrana está inserido na membrana plasmática (barras cinza). Já o domínio intracelular é composto pela região C-terminal da proteína. Possíveis sítios de N-glicosilação estão representados como Y. Adaptado de Levavi-Sivan et al., (2010). 35
- Figura 3** – Principais vias na biossíntese de esteroides sexuais em peixes, a partir do substrato pregnolona. Adaptado de Yaron e Levavi-Sivan (2011). 39
- Figura 4** – Representação da espermatogênese cística em teleósteos. Compartimento germinativo (GC), compartimento intertubular (IC), vasos sanguíneos (BV), células de Leydig (LE), lâmina basal, células mióides peritubulares (MY), células de Sertoli (SE), espermatogônia do tipo A (SGA), espermatogônia do tipo B (SGB), espermatócitos (SC), espermatozoides (SZ) e lúmen tubular (L). Adaptado de Nóbrega et al., (2009). 43
- Figura 5** – Esquema representativo da oogênese, foliculogênese e ovulação no teleósteo marinho *Sciaenops ocellatus* (Perciformes). A linha vermelha corresponde à membrana basal, a qual separa o epitélio germinativo do estroma ovariano. O processo de foliculogênese se inicia com individualização das oogônias pelas células foliculares. Com a ocorrência do crescimento primário e posterior vitelogênese, os oócitos aumentam de diâmetro e ao final deste processo estão aptos à maturação final. Após a ovulação, os oócitos são liberados no lúmen ovariano e os componentes remanescentes do complexo folicular formam o complexo pós-ovulatório. Esta espécie apresenta ovos pelágicos, sendo a gota de lipídeo representada como um círculo branco dentro do oócito. Adaptado de Grier (2012). 45
- Figura 6** – Macho (A) e fêmea (B) adultos de *A. altiparanae*. Escala: 2 cm. 53

Figura 7 – Estrutura do vetor de clonagem pGEM[®]T..... 63

Figura 8 – Alinhamento da região C-terminal das sequências obtidas para Fshr e Lhr de *A. altiparanae* (Characiformes) e *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes). Os aminoácidos marcados em cinza são conservados entre as espécies. Em negrito está apresentada a identidade de aminoácidos das sequências homólogas entre ambas as espécies. 73

Figura 9 – Sequência nucleotídica e de aminoácidos deduzida do cDNA completo para *gpha* (A), *fshb* (B) e *lhb* (C) de *A. altiparanae*. Os códons inicializador e finalizador estão marcados em cinza. Os peptídeos sinais estão sublinhados. Os resíduos de cisteínas estão circulados. Os sítios de poliadenilação estão marcados em preto e os sítios de N-glicosilação estão marcados com um retângulo. O número subscrito indica a extensão da cauda poli A. 78

Figura 10 – Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas para a Gpha (A), Fshb (B) e Lhb (C) de *A. altiparanae* com as sequências de espécies representativas das ordens Characiformes, Siluriformes, Cypriniformes, Osteoglossiformes, Anguilliformes, Salmoniformes, Perciformes e com a humana. Espaços (marcados por um traço) foram introduzidos para melhorar o alinhamento dos resíduos de cisteína. Os peptídeos sinais estão em negrito. Os resíduos de cisteínas estão marcados em cinza e numerados como nos tetrápodes. Os sinais de N-glicosilação estão marcados em preto..... 80

Figura 11 – Relações filogenéticas das subunidades Gpha (A), Fshb (B) e Lhb (C) de *A. altiparanae* com outras espécies. As árvores foram reconstruídas usando o algoritmo Neighbor-Joining algorithm (1.000 replicatas). Os números indicam os *bootstraps* e somente os nós com mais de 50% de *bootstraps* foram indicados. A sequência do hormônio glicoproteico alfa 2 (ACI87878) de *Petromyzon marinus* foi usada como grupo externo na análise da Gpha, ao passo que a sequência da gonadotropina do tipo beta (AW56433) desta mesma espécie foi usada nas análises para Fshb e Lhb. A escala corresponde a 20% de diferença entre as sequências. 83

Figura 12 – Expressão relativa dos mRNAs para *gpha*, *fshb* e *lhb* em diferentes órgãos (n=3) de machos e fêmeas adultas de *A. altiparanae*. Não detectável (ND). Os dados (média $\pm$ o erro padrão da média) foram normalizados em relação aos valores encontrados na hipófise. 83

Figura 13 – Detecção dos mRNAs para *gpha*, *fshb* e *lhb* por hibridização *in situ* (A – D) e caracterização das proteínas Fshb e Lhb na hipófise de *A. altiparanae* com o uso de anticorpos policlonais específicos (E – L). (A) sonda anti-senso para *gpha*, (B) sonda anti-

senso para *fshb*. (C) sonda anti-senso para *lhb* e (D) sonda senso para *gpha*. Hibridizações com as sondas senso para *fshb* e *lhb* apresentaram resultados similares (dados não mostrados). (E) Imunomarcção com anti- *A. altiparanae* Fshb e (F) ampliação da região pontilhada em E. (I) Imunomarcção com anti- *A. altiparanae* Lhb e (J) ampliação da região pontilhada em I. Reações controle utilizando os anticorpos Fshb (G) e Lhb (K) pré-adsorvidos com seus respectivos peptídeos. Reações controle utilizando soro normal de coelho (H) e soro normal de rato (L) em substituição aos anticorpos primários. Note que os cortes A–D, G e K não apresentam a pars intermedia (PI). Rostral pars distalis (RPD), proximal pars distalis (PPD). Escala: 200 µm (A–E, G–I, K, L), 20 µm (F, J)..... 84

Figura 14 – Análise da dualidade das células gonadotrópicas em *A. altiparanae* por imunofluorescência dupla com o uso de anticorpos policlonais específicos. (A, D) Imunomarcção com anti- *A. altiparanae* Fshb marcado com Alexa 488 (fluorescência verde). (B, E) Imunomarcção com anti- *A. altiparanae* Lhb marcado com Alexa 594 (fluorescência vermelha). (D, E) Ampliação de regiões da proximal pars distalis (PPD) vistas em A e B. Note que as marcações para Fshb ou Lhb estão presentes em células gonadotrópicas distintas e que estes sinais não se colocizam. A fluorescência de cada marcação e as imagens sobrepostas (C, F) mostram que estas são derivadas dos mesmos cortes. Rostral pars distalis (RPD) e pars intermedia (PI). Escala: 100 µm (A–C), 10 µm (D–F)..... 86

Figura 15 – Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas do *fshr* de *A. altiparanae*. Os códons iniciador e finalizador estão marcados em cinza. O peptídeo sinal predito está em negrito. Os resíduos de cisteínas estão circulados. Os sítios de poliadenilação estão marcados em cinza escuro. Os sítios de N-glicosilação estão marcados em preto. Nove repetições imperfeitas ricas em leucina estão marcadas por retângulos e os sete domínios transmembrana estão sublinhados. A numeração subscrita indica a extensão da cauda poli A..... 87

Figura 16 – Alinhamento da sequência de aminoácidos traduzidas do Fshr de *A. altiparanae* com outras espécies representativas de diferentes ordens de teleósteos. Espaços marcados com um traço foram inseridos para melhorar o alinhamento dos resíduos de cisteína. O peptídeo sinal está indicado em negrito e itálico. Os resíduos de cisteínas estão marcados em cinza e aqueles altamente conservados estão marcados com um asterisco. Os sítios de N-glicosilação preditos estão marcados em preto. As repetições imperfeitas de leucina estão delimitadas por um retângulo e os domínios transmembrana preditos estão sublinhados. .. 88

Figura 17 – Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas do *lhr* de *A. altiparanae*. Os códons iniciador e finalizador estão marcados em cinza. O peptídeo sinal predito está em negrito. Os resíduos de cisteínas estão circulados. Os sítios de poliadenilação estão marcados em cinza escuro. Os sítios de N-glicosilação estão marcados em preto. Nove repetições imperfeitas ricas em leucina estão marcadas por retângulos. Os domínios transmembrana estão sublinhados. A numeração subscrita indica a extensão da cauda poli A..... 89

Figura 18 – Alinhamento da sequência de aminoácidos traduzidas do *Lhr* de *A. altiparanae* com outras espécies representativas de diferentes ordens de teleósteos. Espaços marcados com um traço foram inseridos para melhorar o alinhamento dos resíduos de cisteína. O peptídeo sinal está indicado em negrito e itálico. Os resíduos de cisteínas estão marcados em cinza e aqueles altamente conservados estão marcados com um asterisco. Os sítios de N-glicosilação preditos estão marcados em preto. As repetições imperfeitas de leucina estão delimitadas por um retângulo e os domínios transmembrana preditos estão sublinhados. .. 90

Figura 19 – Relações filogenéticas do *Fshr* (A) e *Lhr* de *A. altiparanae* com outras espécies de teleósteos. As árvores foram reconstruídas pelo algoritmo Neighbor-Joining com o emprego de 1000 replicatas. Os números indicam a porcentagem de semelhança. Somente os nós com mais de 50% de semelhança foram indicados. As sequências do receptor de hormônio glicoproteico tipo I (AY750688) e (AY750689) da lampreia *Petromyzon marinus* foram usados como grupos externos das árvores para o *Fshr* e *Lhr*, respectivamente. A marcação na barra corresponde a 5% de diferença entre as sequências. 92

Figura 20 – Expressão relativa de *fshr* (A) e *lhr* (B) em vários órgãos de *A. altiparanae*. Asteriscos indicam diferenças significativas após o teste de Tukey. (***) denota um valor de $P < 0.001$ 93

Figura 21 – Imunodeteção de *Fshr* (A – D) e *Lhr* (F – H) no ovário de *A. altiparanae*. Oócitos vitelogênicos (Vo), oócitos alvéolo cortical (Ca) e oócitos perinucleolares (Po). Escala: 100 µm (A, E, F), 20 µm (B – D, G,H)..... 94

Figura 22 – Detecção de *Fshr* (A – E) e *Lhr* (F – I) por imunoperoxidase e imunofluorescência dupla (J – K) no testículo de *A. altiparanae*. (J, N) Imagens de epifluorescência. (K, O) Imunomarcacão com anti- *S. senegalensis* *Fshr* marcado com Alexa 488 (fluorescência verde). (L, P) Imunomarcacão com anti- *S. senegalensis* *Lhr* marcado com Alexa 594 (fluorescência vermelha). A fluorescência de cada marcação e as imagens

sobrepostas (M, Q) mostram que estas são derivadas dos mesmos cortes. Escala: 100 µm (A, B, F), 50 µm (J – Q), 20 µm (C – E, G – I). 95

Figura 23 – Índices gonadossomático (A), Hepatossomático (B) e cortes histológicos representativos dos ovários de fêmeas adultas de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo anual em cativeiro, de setembro de 2012 a julho 2013. Meses que apresentam a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,5$). O IGS variou significativamente ao longo ano, ao passo que o IHS não. Note que oócitos vitelogênicos (Vo) estão presentes durante todos os meses amostrados, enquanto nenhum folículo pós-ovulatório é observado. Oócitos atrésicos (Ao), oócitos alvéolo cortical (Ca) e oócitos perinucleolares (Po). Escala: 500 µm. 97

Figura 24 – IGS (A), IHS (B) e cortes histológicos representativos dos testículos (C–H) dos machos adultos de *A. altiparanae* analisados durante o ciclo reprodutivo anual em cativeiro. Interstício (asteriscos), espermatogônias (seta), espermatócitos (St), espermatozoides (Sz), lúmen testicular (Lu). Escala: 50 µm. 98

Figura 25 – Expressão relativa dos mRNAs para *gpha* (A), *fshb* (B) e *lhb* (C) nas fêmeas adultas de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro, de setembro de 2012 a julho de 2013. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados em julho de 2013 (coluna branca). Asteriscos denotam diferentes níveis de significância após o teste de Tukey, $^*(p < 0,05)$ e $^{**}(p < 0,01)$ 100

Figura 26 – Expressão relativa dos mRNAs para *gpha* (A), *fshb* (B) e *Lhb* (C) em machos adultos de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro, de setembro de 2012 a julho de 2013. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados em julho de 2013 (coluna branca). Asteriscos denotam diferentes níveis de significância após o teste de Tukey, $^*(p < 0,05)$, $^{**}(p < 0,01)$ e $^{***}(p < 0,001)$ 102

Figura 27 – Expressão de mRNAs para *fshr* e *lhr* nos ovários de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro. Os dados estão expressões como média $\pm$ erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados em janeiro de 2013 (coluna branca). Asteriscos denotam diferentes níveis de significância após o teste de Tukey, $^*(p < 0,05)$, $^{**}(p < 0,01)$ e $^{***}(p < 0,001)$ 103

Figura 28 – Expressão de mRNAs para *fshr* e *lhr* nos testículos de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro. Asteriscos denotam diferentes níveis de significância após o teste de Tukey, *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$). 104

Figura 29 – Níveis plasmáticos de E_2 (A) e $17\alpha, 20\beta$ -DHP (B) em fêmeas adultas de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo anual em cativeiro, de setembro de 2012 a julho de 2013. Os dados estão expressões como média $\pm$ erro padrão da média e os meses que compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas após o teste de Tukey ($p < 0,05$). 104

Figura 30 – Níveis plasmáticos de T e 11-kt em machos adultos de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro de setembro de 2012 a julho de 2013. Os dados estão expressões como média $\pm$ erro padrão da média. Os meses com letras diferentes apresentam diferenças estatísticas após o teste de Tukey ($p < 0,05$). 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados na clonagem de fragmentos dos cDNAs de diversos genes <i>A. altiparanae</i>	62
Tabela 2 – Primers utilizados nas reações de RACE PCR.	64
Tabela 3 – Número de acesso ao GenBank das sequências de aminoácidos para as subunidades das gonadotropinas usadas no alinhamento múltiplo e na análise filogenética.	66
Tabela 4 – Números de acesso ao GenBank das sequências de aminoácidos dos receptores de gonadotropinas usados no alinhamento múltiplo e na análise filogenética.	67
Tabela 5 – Primers validados e utilizados nos ensaios de qPCR em <i>A. altiparanae</i>	68
Tabela 6 – Primers usados na síntese das sondas para hibridização <i>in situ</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 β -HSD - 3 β -hydroxiesteroide desidrogenase
11-kt - 11 cetotestosterona
17 α ,20 β -DHP - 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one
Ao - Oócitos atrésicos
Ca - Oócitos alvéolo cortical
E₂-17 β - estradiol
ECD - domínio extracelular
elfa1 - gene para o fato de elongação alfa um.
fshb/Fshb – Gene/proteína para a subunidade beta do hormônio folículo-estimulante
fshr/Fshr – Gene/proteína para o receptor do hormônio folículo-estimulante
gnrh/GnRH – Gene/proteína para o hormônio liberador de gonadotropinas
gpha/Gpha – Gene/proteína para a subunidade alfa das gonadotropinas
IT - domínio intracelular
lhb/Lhb – Gene/proteína para a subunidade beta do hormônio luteinizante
lhr/Lhr – Gene/proteína para o receptor do hormônio luteinizante
NH - neuro-hipófise
ORF - *open reading frame* (região codificante)
pb - pares de base
PI - pars intermedia
Po - Oócitos perinucleolares
PPD - proximalis pars distalis
RPD - rostralis pars distalis
Star - proteína esteroideogênica regulatória aguda
T - Testosterona
TD - domínio transmembrana
Tsh - Tireotropina
Tshb - Proteína para a subunidade beta da tireotropina
UTR - *Untranslated region* (região não codificante)
Vo - Oócitos vitelogênicos

LISTA DE SÍMBOLOS

Aminoácidos

G - Licina.

A - Alanina.

L - Leucina.

V - Valina.

I - Isoleucina.

P - Prolina.

F - Fenilalanina.

S - Serina.

T - Treonina.

C - Cisteina.

Y - Tirosina.

N - Asparagina.

Q - Glutamina.

D - Ácido aspártico.

E - Ácido glutâmico.

R - Arginina.

K - Lisina.

H - Histidina.

W - Triptofano.

M – Metionina

Cys – Cisteina

Ile - Isoleucina

Ser – Serina

Asn – Asparagina

Glu – Glutamina

Thr – Treonina

His – Histidina

Bases nitrogenadas dos nucleótídeos

A - Adenina.

T - Timina.

C - Citosina.

G - Guanina.

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	26
1.1 O eixo hipotálamo-hipófise-gônadas	26
1.2 Hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH)	26
1.3 Gonadotropinas	28
1.4 Gonadotropinas extra-hipofisárias	31
1.5 Células gonadotrópicas	32
1.6 Receptores de gonadotropinas	35
1.7 Esteroides sexuais e esteroidogênese gonadal	38
1.8 Espermatogênese nos teleósteos	41
1.9 Oogênese nos teleósteos	44
1.10 Fases reprodutivas	48
1.11 Disfunções reprodutivas em cativeiro	50
1.12 Espécie modelo: <i>Astyanax altiparanae</i>	53
2 OBJETIVOS	57
2.1 Objetivos gerais	57
2.2 Objetivos específicos	57
3 MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1 Animais e coleta de material biológico	58
3.2 Extração de RNA total	60
3.3 Síntese de cDNA	61
3.4 Clonagem molecular	61
3.4.1 <i>Rapid amplification of cDNA ends (RACE 3' e 5')</i>	64
3.5 Análises estruturais e filogenéticas	65
3.6 Análises de expressão gênica - PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	67
3.7 Hibridização <i>in situ</i>	69
3.8 Produção de anticorpos policlonais contra as subunidades beta das gonadotropinas	70

3.9 Imuno-histoquímica e imunofluorescência dupla para a detecção de Fshb e Lhb na hipófise	71
3.10 Imuno-histoquímica e imunofluorescência dupla para a detecção de Fshr e Lhr nas gônadas.....	72
3.11 Dosagens de esteroides sexuais	75
3.12 Histologia gonadal	75
3.13 Análise estatística	76
4 RESULTADOS	77
4.1 Clonagem de fragmentos parciais para os genes <i>gpha</i> , <i>fshb</i> , <i>lhb</i> , <i>fshr</i> , <i>lhr</i> e <i>elfa1</i>	77
4.2 Caracterização molecular das subunidades <i>gpha</i> , <i>fshb</i> e <i>lhb</i>	77
4.3 Expressão de mRNAs das subunidades das gonadotropinas em diferentes órgãos	83
4.4 Localização dos mRNAs e proteínas das subunidades das gonadotropinas na hipófise	83
4.5 Caracterização molecular dos receptores de gonadotropinas.....	86
4.6 Investigação da expressão dos receptores de gonadotropinas em diferentes órgãos....	92
4.7 Localização das proteínas Fshr e Lhr no ovário e testículo	93
4.8 Parâmetros reprodutivos nas fêmeas e machos durante o ciclo reprodutivo em cativeiro	96
4.9 Expressão temporal dos mRNAs para as gonadotropinas na hipófise das fêmeas e machos.....	100
4.10 Expressão temporal dos mRNAs para os receptores de gonadotropinas nas gônadas de fêmeas e machos.....	103
4.11 Níveis plasmáticos de esteroides sexuais nas fêmeas e machos	104
5 DISCUSSÃO	106
5.1 Caracterização molecular das subunidades das gonadotropinas e seus receptores....	106
5.2 Expressão celular e tecidual das subunidades das gonadotropinas e seus receptores	110
5.3 Perfis de expressão gênica das subunidades das gonadotropinas e dos receptores de gonadotropinas, e níveis plasmáticos de esteroides sexuais ao longo do ciclo reprodutivo em cativeiro	116
5.4 Parâmetros reprodutivos ao longo do ciclo reprodutivo em cativeiro.....	124
6 CONCLUSÃO	127
REFERÊNCIAS	128

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O eixo hipotálamo-hipófise-gônadas

A reprodução é um processo essencial para a perpetuação das espécies e, nos vertebrados, envolve uma intrincada coordenação fisiológica, representada por vários hormônios que podem atuar em diversos graus de complexidade, refletindo diretamente nas especificidades do processo reprodutivo de cada espécie (BENTLEY, 1998). Assim como nos demais vertebrados, a reprodução nos peixes teleósteos é internamente regulada por um sistema hierarquizado e orquestrado por diferentes órgãos, tipos celulares, hormônios e seus receptores, os quais em conjunto formam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadas (HPG) (YARON; LEVAVI-SIVAN, 2011).

De uma forma geral, estímulos ambientais como fotoperíodo, temperatura e aumento da pluviosidade, em conjunto com sinais sociais, são percebidos e convertidos em sinais eletroquímicos, que são transmitidos por neurônios sensoriais até o hipotálamo e estimulam a síntese e liberação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). Este, regulado pela Kisspeptina, é conduzido pelas fibras nervosas oriundas do hipotálamo até a adeno-hipófise, estimulando a secreção de gonadotropinas pelas células gonadotrópicas (ZOHAR et al., 2010).

As gonadotropinas (GtHs), o hormônio folículo estimulante (Fsh) e luteinizante (Lh), são transportadas pela corrente sanguínea até as gônadas e, por meio da ativação de seus receptores (Fshr e Lhr) presentes em tipos celulares específicos, desencadeiam a produção de diferentes esteroides sexuais. Estes, por sua vez, atuarão diretamente regulando as diferentes fases do processo de gametogênese e a liberação dos gametas, ou, indiretamente, por meio da produção e atividade de fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras (LEVAVI-SIVAN et al., 2010; ZOHAR et al., 2010).

1.2 Hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH)

No topo da regulação do eixo HPG encontra-se o GnRH, um decapeptídeo com vários resíduos de aminoácidos conservados entre os vertebrados. Além da sua função hipofisiotrófica, o GnRH também atua como neuromodulador e regulador do comportamento sexual (ZOHAR et al., 2010). Desde a sua descoberta nos teleósteos, pesquisas envolvendo este hormônio tem ganhado cada vez mais atenção, devido a seu potencial uso na aquicultura (MYLONAS et al., 2010) e, também, como um marcador de estudos evolutivos, pois, embora exista um total de 30 variantes de GnRH identificados em invertebrados e vertebrados, estas formas apresentam um certo grau de conservação em sua estrutura gênica, proteica e funções biológicas (GOMES; COSTA; BORELA, 2013).

Cada espécie apresenta duas ou três formas, sendo chamadas de GnRH 1, 2 ou 3. Estas formas de GnRH estão distribuídas em três populações de neurônios distintas no encéfalo, com reflexo na sua diversidade filogenética e funções biológicas. O GnRH1 é expresso por neurônios hipotalâmicos e relaciona-se à função reprodutiva. Já a variante GnRH2 é expressa no tegumento do encéfalo médio e atua como neuromodulador, ao passo que o GnRH3 é expresso no nervo terminal/telencéfalo ventral, e pode estar relacionado a ambas funções (ZOHAR et al., 2010).

Os padrões de síntese e secreção de GnRH variam durante o ciclo de vida dos peixes, e sua regulação está intimamente associada com o ciclo reprodutivo (ZOHAR et al., 2010). Em *Oncorhynchus masou* (Salmoniformes), a expressão de mRNAs para *gnrh* coincide com o aumento do índice gonadosomático (AMANO et al., 1991), bem como com os estágios finais da migração reprodutiva e maturação final das gônadas. Em *Morone saxatilis* (Perciformes) os níveis de GnRH1 e 2 aumentam durante a recrudescência gonadal e têm um pico próximo ao momento da desova em machos e fêmeas (HOLLAND; HASSIN; ZOHAR, 2001). De forma geral, os resultados evidenciam uma estreita relação entre a expressão de GnRH2 e a atividade reprodutiva nos adultos. Ainda, o GnRH2 e 3 devem ter outras funções neuroendócrinas na reprodução além daquelas ligadas à função hipofisiotrófica.

Estudos sobre as flutuações nos níveis de GnRH durante o ciclo reprodutivo em espécies sul-americanas são praticamente inexistentes, à exceção dos dados obtidos em fêmeas de *Odonthestes bonarienses* (Atheriniformes). Nesta, foram detectadas quantidades significantes dos transcritos para as três variantes no encéfalo. Os níveis de *gnrh1* variaram em correlação com a condição gonadal, enquanto os maiores níveis de *gnrh3* ocorreram durante os estágios iniciais do desenvolvimento ovariano (GUILGUR; STRUSSMANN; SOMOZA, 2009).

Em relação às espécies nativas, existe apenas um estudo recente sobre a caracterização molecular dos GnRHs em *Astyanax altiparane* (Characiformes) e seus padrões de expressão gênica ao longo do estímulo reprodutivo em fêmeas submetidas a injeção de três isoformas (peptídeos) comerciais de GnRH (GOMES; CASSEL; BORELLA, 2005). Este estudo revelou que esta espécie apresenta apenas duas isoformas de GnRH, a 2 e a 3. No entanto, os três GnRHs injetados estimularam a expressão de *lhb*, mas não do *fshb*. Apenas o GnRH 2 estimulou o aumento na produção do hormônio indutor da maturação, culminando com desova dos animais. Ainda, foi evidenciado que o GnRH2 possivelmente está associado ao comportamento reprodutivo, ao passo que o GnRH3 deve ser a forma hipofisiotrópica em *Astyanax altiparane* (GOMES; CASSEL; BORELLA, 2005).

Embora o GnRH seja o principal neuropeptídeo regulador da síntese e liberação de gonadotropinas, outros neurohormônios e neurotransmissores como o ácido γ -aminobutírico (GABA), neuropeptídeo Y (NPY), hormônio inibidor de gonadotropinas (GnIH), dopamina, e o peptídeo ativador da adenilatociclase (PACAP) também podem modular estas funções *in vivo* ou *in vitro* (ZOHAR et al., 2010).

1.3 Gonadotropinas

As gonadotropinas, denominadas de hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), juntamente com a tireotropina (TSH), constituem uma família de hormônios adeno-hipofisários glicoprotéicos (SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003). Como nos

mamíferos, estes três hormônios são formados por duas subunidades distintas, uma alfa e uma beta, ligadas não covalentemente entre si (KAWAUCHI; SOWER, 2006).

A subunidade alfa (Gpha) apresenta a mesma sequência de aminoácidos nos três hormônios em cada espécie. Ainda, esta subunidade atua na estabilização do heterodímero, no dobramento da proteína e na transdução de sinal (PIERCE; PARSONS, 1981). Por outro lado, a subunidade beta (Fshb/Lhb/Tshb) é estruturalmente diferente, sendo responsável pelas funções biológicas específicas de cada hormônio. A heterodimerização é acompanhada por várias mudanças conformacionais e pós-traducionais. Esta etapa é um pré-requisito para a secreção das gonadotropinas e necessária para atingir sua completa bioatividade, uma vez que as subunidades livres são degradadas intracelularmente e não apresentam especificidade aos seus receptores (PIERCE; PARSONS, 1981).

As gonadotropinas são heterodímeros com cadeias de 30 a 50 kDa. A sequência de aminoácido do Lhb é altamente conservada, particularmente nas regiões responsáveis pela interação com o receptor. Em contraste, a estrutura primária do Fshb é mais variável do que o Lhb, mesmo em regiões de interação com seu receptor. Isto pode resultar em diferenças na natureza das interações com o receptor, na estabilidade do heterodímero, e ainda alterar a intensidade do seu efeito biológico nas diferentes espécies de peixes (SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003).

O papel funcional de cada gonadotropina durante o ciclo reprodutivo e durante a diferenciação gonadal dos teleósteos ainda não foi completamente elucidado (SHIMIZU; KAGAWA; TANAKA, 2003a). Em relação ao ciclo reprodutivo, a maioria dos dados disponíveis é de espécies de salmonídeos (LEVAVI-SIVAN et al., 2009). Nestes, o Fsh atua no início dos eventos reprodutivos, como na vitelogênese e espermatogênese, enquanto o Lh atua na maturação final dos oócitos e ovulação nas fêmeas, além da espermição nos machos (SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003).

Já em não salmonídeos, as informações são mais restritas ao Lh, devido à falta de imunoenaios para o Fsh em outras espécies. Entretanto, estudos em não salmonídeos sobre a expressão das subunidades constituintes das gonadotropinas têm mostrado que,

em espécies que reproduzem apenas uma vez durante o ciclo de vida (*single spawners*), os padrões de expressão gênica para *fshb* e *lhb* são semelhante aos encontrados em salmonídeos, com uma clara prevalência do *lh* nos eventos finais da maturação gonadal (Kim et al., 2005). Por outro lado, as espécies com múltiplas reproduções ao longo do ciclo de vida (*multiple spawners*), expressam de forma progressiva e simultânea os genes *fshb* e *lhb* durante a maturação gonadal (SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003).

Os dados disponíveis sobre a expressão de gonadotropinas em espécies sul-americanas também se restringem a fêmeas de *Odontesthes bonariensis*. Nesta, os transcritos para *fshb* e *gpha* aumentam a partir da fase alvéolo-cortical e durante a maturação final, e os níveis de *lhb* só estavam elevados durante esta última etapa. Ainda, os menores níveis de expressão gênica para os três genes foram detectados durante a fase de atresia (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2014).

Frente à diversidade reprodutiva dos peixes teleósteos, os papéis funcionais de cada gonadotropina durante o ciclo reprodutivo ainda não foram completamente esclarecidos (LEVAVI-SIVAN et al., 2010) e novos estudos em espécies de diferentes ordens e estratégias reprodutivas tornam-se necessários. A partir de clonagem molecular, as informações existentes sobre a regulação e os padrões de expressão gênica das gonadotropinas durante o ciclo reprodutivo são disponíveis principalmente em espécies de clima temperado, de representantes das ordens Atheriniformes, Cypriniformes, Cyprinodontiformes, Perciformes, Pleuronectiformes, Salmoniformes e Siluriforme (LEVAVI-SIVAN et al., 2010). Os avanços no esclarecimento das funções biológicas destes hormônios e seus receptores têm sido alcançados de forma lenta, principalmente devido à falta de proteínas purificadas, particularmente no caso do Fsh (SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003). Assim, a clonagem molecular e caracterização das gonadotropinas de representantes de outras ordens de teleósteos, como nos Characiformes, representa um passo importante para o esclarecimento dos aspectos biológicos destes hormônios reguladores do processo reprodutivo.

Em relação às espécies nativas, existem dados sobre o isolamento dos cDNAs completos para as três subunidades das gonadotropinas do pirarucu *Arapaima gigas* (CARVALHO, 2014; FARIA et al., 2013, SEVILHANO, 2015). Recentemente foi reportado o isolamento de sequências parciais dos cDNAs para *fshb* e *lhb* de duas espécies de Characiformes, tabarana *Salminus hillari* (MOREIRA et al., 2015) e pacu *Piaractus mesopotamicus* (KURADORUMI et al., 2015) e, ainda, de uma espécie de Siluriformes, o mapará *Hypophthalmus marginatus* (HAINFELLNER, 2015) e no acará *Cichlasoma dimerus* (Perciformes) (PANDOLFI et al., 2009).

1.4 Gonadotropinas extra-hipofisárias

Embora a hipófise seja o principal sítio de secreção de gonadotropinas nos teleósteos, diversos estudos também têm detectado a produção de gonadotropinas (mRNAs e proteínas) em outros órgãos (LEVAVI-SIVAN et al., 2010), assim com visto nos mamíferos (CHU; GAO; HUANG, 2008; LITICHEVER et al., 2009, MARKKULA et al., 1995).

Em *Sparus aurata* (Perciformes), foi detectada a síntese e liberação de gonadotropinas pelos oócitos, e esse processo era acentuado pela administração de um análogo de GnRH, ou reduzido por seu antagonista (WONG; ZOHAR, 2004). Em *Oreochromis niloticus* (Perciformes) foram detectados transcritos para *fshb* e *lhb* no encéfalo (PARHAR et al., 2003). Além disso, em *Cichlasoma dimerus* (Perciformes) foram detectadas gonadotropinas no encéfalo e ovários. Os neurônios imunorreativos ao Fshb e Lhb se localizavam na área pré-óptica e seus prolongamentos se direcionavam para diferentes áreas do encéfalo e à neuro-hipófise. Estes resultados foram obtidos por imuno-histoquímica e confirmados pela detecção de seus respectivos transcritos no encéfalo. Nos ovários, uma imunoreatividade para ambas gonadotropinas foi detectada no citoplasma dos oócitos pré-vitotelogênicos e no início da vitelogênese (PANDOLFI et al., 2006).

Em *Danio rerio* (Cypriniformes), também foi demonstrada a presença de *fshb* e *lhb* nos testículos e ovários, bem como em outros órgãos e tecidos, como no rim cefálico, músculo, fígado e brânquias (SO; KWOK; GE, 2005). Já em *Odontesthes bonariensis*

(Atheriniformes), os transcritos para *gpha*, *fshb* e *lhb* foram detectadas no encéfalo, testículo e ovário de animais sexualmente maduros e imaturos (ELISIO et al., 2012). Nos ovários, a expressão de *gpha* foi observada no citoplasma das oogônias e de oócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos, ao passo que o *lhb* foi detectado apenas nos oócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos. No testículo, a expressão das três subunidades foi observada nas espermatogônias, enquanto que sinais mais fracos foram detectados nos espermátócitos. Entretanto, embora os três transcritos fossem detectados no encéfalo por RT-PCR, os autores não conseguiram investigar a expressão celular destes pela técnica de hibridização *in situ* (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2014). Interessantemente, neste estudo, os autores também demonstraram que o aumento da temperatura reduz os níveis de expressão de *gpha*, *fshb* e *lhb* nos três órgãos analisados em ambos os sexos, com a exceção dos níveis de *fshb* no encéfalo.

O papel da produção das gonadotropinas no encéfalo não está claro, mas tem sido especulada uma função no desenvolvimento do encéfalo, na neuromodulação, na regulação da atividade das células adeno-hipofisárias e no comportamento sexual (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2014; PANDOLFI et al., 2009). Já nos ovários, possivelmente atuam como fatores autócrinos e/ou parácrinos envolvidos na comunicação entre os oócitos e as células foliculares. Ainda, é especulada a existência de um eixo GnRH/GtHs nos ovários em algumas espécies de teleósteos, devido a responsividade destes frente ao GnRH exógeno em *Sparus aurata* (Wong; Zohar, 2004) e a expressão de GnRH e um dos seus receptores (GnRH-R 2) nos ovários de *Odontesthes bonariensis* (GUILGUR; STRUSSMANN; SOMOZA, 2009). Em relação ao testículo, pouco se sabe quais tipos celulares expressam as subunidades das gonadotropinas, bem como suas possíveis funções.

1.5 Células gonadotrópicas

As gonadotropinas são produzidas pelas células gonadotrópicas, as quais se localizam na *proximal pars distalis* (PPD) da hipófise dos teleósteos (Figura 1).

Figura 1 – Secções sagitais da hipófise de *A. altiparanae* coradas por Tricômico de Mallory (A, B) e pelo Ácido periódico – Reativo de Schiff (PAS) (C). Observe as três regiões adeno-hipofisárias (A, C), rostral pars distalis (RPD), proximal pars distalis (RPD) e pars intermedia (PI) e as ramificações da neuro-hipófise (asteriscos). Em (B), um detalhe da PPD evidenciando as células gonadotrópicas intensamente cianófilas e com vacúolos citoplasmáticos (setas). Em (C) note a positividade das células gonadotrópicas ao PAS. Escala: 100 µm (A, C), 20 µm (B).

Estas células apresentam formato globoso, núcleo excêntrico, variável número e tamanho de grânulos secretórios, além de vacúolos de tamanho variável originados pelas cisternas do retículo endoplasmático rugoso diferencialmente dilatadas (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2002).

As células gonadotrópicas apresentam afinidade por corantes básicos e, devido à natureza glicoproteica das gonadotropinas, também são reativas ao Ácido Periódico - Reativo de Schiff (BORELLA; VENTURIERI; MANCERA, 2009; KASPER et al., 2006), ver Figura 1. Entretanto, a diferenciação deste tipo celular em células produtoras de Fsh ou Lh só é possível com a aplicação de técnicas mais sensíveis, como a imuno-histoquímica e a hibridização *in situ* (AGULLEIRO; GARCÍA-HERNANDEZ; GARCÍA-AYALA, 2006; WELTZIEN et al., 2004).

Entre as células adeno-hipofisárias de teleósteos, as células gonadotrópicas são as últimas a diferenciarem-se e tornarem-se funcionais durante o desenvolvimento inicial, e

pouco se conhece em relação à regulação da maturação destes tipos celulares (WELTZIEN et al., 2014). Adicionalmente, as células gonadotrópicas apresentam consideráveis mudanças em relação ao volume ocupado na hipófise e às características morfológicas ao longo do ciclo reprodutivo (NAITO et al. 1991,1993, NOZAKI et al., 1990, SHIMIZU; TANAKA;KAGAWA, 2003b, VONGVATCHARANON et al.; 2005) ou sob condições experimentais (CHABBI; GANESH, 2012; GOLAN; BIRAN; LEVAVI-SIVAN, 2014, GOLAN; LEVAVI-SIVAN, 2013).

Embora seja bem estabelecida a presença de duas gonadotropinas nos teleósteos (LEVAVI-SIVAN et al., 2010), ainda não está claro se estes hormônios são produzidos por uma única célula gonadotrópica, assim como nos mamíferos, ou por dois tipos celulares (KAWAUCHI; SOWER, 2006). Duas células gonadotrópicas distintas, produtoras de Fsh e Lh, têm sido detectadas em espécies de diferentes ordens de teleósteos (KAGAWA et al., 1998; MIRANDA; STRUSSMANN; SOMOZA, 2001; NOZAKI et al., 1990; PANDOLFI et al., 2009; SHIMIZU et al., 2003a), bem como uma terceira população de células que expressa ambas gonadotropinas (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2002; KASPER et al., 2006; MAGLIULO-CEPRIANO; SCHREIBMAN; BLUM,1994; VISSIO et al., 1997).

Entretanto, conforme revisão de Jesus et al. (2014), muitos destes estudos foram realizados com o emprego de anticorpos heterólogos e apresentaram resultados conflitantes. Os quais podem ter sido gerados devido às diferenças evolutivas entre as cadeias das gonadotropinas das espécies analisadas em relação àquelas utilizadas para o desenvolvimento dos anticorpos, especialmente no caso do Fsh (AGULLEIRO; GARCÍA-HERNANDEZ; GARCÍA-AYALA, 2006).

Dada a importância das células gonadotrópicas e seus hormônios, estas células têm sido alvo de vários estudos relacionados aos mais diversos aspectos, como ao longo da ontogenia/diferenciação gonadal dos peixes (GRANDI et al., 2014; JESUS et al., 2014, PANDOLFI et al., 2009), durante o ciclo reprodutivo (HONJI et al., 2013; NAITO et al., 1991; NOZAKI et al., 1990; SHIMIZU et al., 2003b; VONGVATCHARANON et al., 2005), migração

(MUKAI; OOTA, 1995) ou, ainda, sob diferentes condições experimentais (CHABBI; GANESH, 2012; GOLAN; BIRAN; LEVAVI-SIVAN, 2014; NAGAHAMA, PETER, 1992).

1.6 Receptores de gonadotropinas

As gonadotropinas exercem suas funções biológicas a partir da ligação e ativação de seus receptores cognatos (Fshr e Lhr), os quais estão presentes na superfície de células-alvo presentes nas gônadas (LEVAVI-SIVAN et al., 2010). Estes, assim como as subunidades constituintes das gonadotropina, são codificados por diferentes genes parálogos (BOGERD et al., 2005). Os receptores de gonadotropinas são acoplados à proteína G (GPCRs) e são membros da família de receptores do tipo Rodopsina, sendo compostos por um extenso domínio extracelular aminoterminal, um domínio transmembrana hepta-helicoidal e por um curto domínio carboxiterminal citoplasmático (BOGERD et al., 2005), Figura 2.

Figura 2 – Esquema da organização dos receptores de gonadotropinas. A região N-terminal compreende o domínio extracelular (ETC), o qual apresenta dez cadeias beta-pregueadas. O domínio transmembrana está inserido na membrana plasmática (barras cinza). Já o domínio intracelular é composto pela região C-terminal da proteína. Possíveis sítios de N-glicosilação estão representados como Y. Adaptado de Levavi-Sivan et al., (2010).

O domínio extracelular (ECD) representa mais da metade da extensão da proteína e contribui para o reconhecimento e especificidade da ligação com seu ligante. Por consequência, este domínio apresenta baixa homologia entre o Fshr e Lhr (KUMAR; TRANT, 2001). O domínio transmembrana (TM) compreende a região mais conservada destes receptores em relação à estrutura e sequência de aminoácidos. Esta região atua na ativação do receptor e na transdução de sinal. Já o domínio intracelular (IT) apresenta alta variabilidade em sua sequência de aminoácidos, porém todos apresentam sítios de fosforilação por quinases intracelulares. Ainda, apresenta resíduos envolvidos no acoplamento da proteína G, em seu dobramento e na ligação de diferentes moléculas de sinalização intracelular (LEVAVI-SIVAN et al., 2010).

Nos últimos anos têm crescido o número de estudos envolvendo a clonagem dos cDNAs para os receptores de gonadotropinas nas mais diversas grupos e espécies de teleósteos. A partir destas sequências, análises filogenéticas sugerem que os receptores de gonadotropinas foram altamente conservados durante a evolução dos vertebrados, e a sequência de aminoácidos em peixes apresenta alta homologia com as sequências de mamífero, aves e répteis (LEVAVI-SIVAN et al., 2010). Entretanto, diferentemente dos mamíferos, a funcionalidade e a expressão espaço-temporal dos receptores de gonadotropinas não estão totalmente esclarecidas.

Os receptores de gonadotropinas são majoritariamente expressos nas gônadas, porém, também é relatada a sua expressão em outros órgãos como no rim cefálico e encéfalo (KUMAR; IJIRI; TRANT, 2001). O Lhr é expresso nas células da granulosa e nas células de Leydig, ao passo que o Fshr é encontrado nas células da teca, da granulosa e também nas células de Sertoli (KUMAR; TRANT, 2001; SCHULZ et al., 2001).

Entretanto, interessante, a presença de Fshr foi detectada nas células de Leydig de espécies das ordens Anguilliformes (OHTA et al., 2007), Siluriformes (GÁRCIA-LOPES et al., 2009) e Pleuronectiformes (CHAUVIGNÉ et al., 2012), sugerindo que, diferente dos mamíferos, a atividade esteroidogênica das células de Leydig em peixes é regulada por ambas gonadotropinas (SCHULZ et al., 2010).

Ainda, estudos recentes detectaram a expressão de Lhr nas células de Sertoli de *Danio rerio* (Cypriniformes, GARCÍA-LÓPEZ et al., 2010) e também a expressão proteica de Lhr nas espermatídes desta espécie, em *Sparus aurata* (Perciformes) e em *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes), (CHAUVIGNÉ et al., 2014).

A disponibilidade de gonadotropinas recombinantes de diferentes espécies de peixes, em paralelo à clonagem dos receptores de gonadotropinas em um número cada vez maior de espécies, têm permitido a realização de análises funcionais e modelagem das possíveis interações entre estes ligantes e seus receptores, contribuindo assim para um maior esclarecimento sobre as interações entre as gonadotropinas e seus receptores (AIZEN et al., 2012).

Em mamíferos, em condições fisiológicas, o FSHR e o LHR são ativados de forma específica por seus ligantes, apresentando uma seletividade bem definida (BOGERD et al., 2005). Entretanto, análises funcionais a partir da expressão destes receptores de peixes em linhagens celulares têm evidenciado que, nos teleósteos, os receptores de gonadotropinas são menos discriminatórios, devido à existência de promiscuidade na interação destes receptores com seus ligantes (LEVAVI-SIVAN et al., 2010; SCHULZ et al., 2001). Porém, resultados diferenciados têm sido relatados com o uso de gonadotropinas específicas ou de espécies filogeneticamente próximas.

Em *Dicentrarchus labrax* (Perciformes), cada receptor é ativado de forma específica por seus respectivos hormônios recombinantes (ROCHA et al., 2007). Este mesmo padrão foi observado em *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes), com o emprego de hormônios específicos purificados (SAMBRONI et al., 2007). Por outro lado, em *Danio rerio* (Cypriniformes) e *Solea senegalensis* (Pleuroectiformes), utilizando-se gonadotropinas recombinantes, foi observado que o Lhr é especificamente ativado pelo Lh, ao passo que o Fshr pode ser estimulado por ambas gonadotropinas (CHAUVIGNÉ et al., 2012; SO et al., 2005). De forma geral, tem sido sugerido que o Lhr apresenta alta seletividade, como em mamíferos. Já a seletividade do Fshr parece ser espécie ou táxon-específico (AIZEN et al., 2012; LEVAVI-SIVAN et al., 2010). Esta variação na interação entre gonadotropinas e seus

receptores em um limitado número de espécies torna interessante analisar se este mecanismo também ocorre em outros grupos de teleósteos, como nos Characiformes.

Poucos estudos têm reportado os padrões de expressão gênica de *fshr* e *lhr* durante o ciclo reprodutivo em peixes, especialmente em machos. Os estudos existentes indicam que nas fêmeas o *fshr* está associado com a recrudescência ovariana (KUMAR; TRANT, 2001) e, curiosamente, também na maturação final dos oócitos e na ovulação, sendo estes dois últimos eventos inicialmente relacionados apenas à atividade do *lhr*. Em *Odontesthes bonariensis*, os níveis de *fshr* aumentam durante a vitelogênese, enquanto os níveis de *lhr* aumentam significativamente durante o final da vitelogênese e maturação final (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2014). Similarmente, nos machos, os níveis de *fshr* flutuam no início do ciclo reprodutivo, mas também aumentam durante a espermição (LEVAVI-SIVAN et al., 2010).

1.7 Esteroides sexuais e esteroidogênese gonadal

A porção inferior do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas é funcionalmente representada pelos esteroides sexuais, os quais são sintetizados em decorrência da ativação dos receptores de gonadotropinas presentes em células somáticas nas gônadas. Os níveis plasmáticos dos esteroides sexuais sofrem importantes variações durante o ciclo reprodutivo nos machos e fêmeas (LUBZENS et al., 2010, SCHULZ et al., 2010), indicando ao encéfalo e hipófise o status reprodutivo do animal, de forma a modular a síntese de GnRH e gonadotropinas por meio de um intrincado sistema de retroalimentação positiva e negativa, além de controlarem o comportamento e o período reprodutivo (ZOHAR et al., 2010).

As vias metabólicas relacionadas à esteroidogênese gonadal nos peixes (Figura 3) são similares às de outros vertebrados, com poucas diferenças (YARON; LEVAVI-SIVAN, 2013). O processo se inicia com o transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna, pela atividade da proteína esteroidogênica regulatória aguda (Star), a qual é influenciada pela estimulação das gonadotropinas. Então, o colesterol é convertido em

pregnenolona pela enzima P450_{scc}, uma etapa limitante da biossíntese de esteroides. A seguir, ocorrem várias reações catalisadas pelas enzimas P450_{c17} e 3 β -hydroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD), que resultarão nos substratos necessários para síntese dos produtos finais.

Figura 3 – Principais vias na biossíntese de esteroides sexuais em peixes, a partir do substrato pregnenolona. Adaptado de Yaron e Levavi-Sivan (2011).

Nas fêmeas, o Fsh estimula a conversão do colesterol em testosterona (T) nas células da teca, a qual é aromatizada pela enzima aromatase (P450_{arom}) e convertida em 17 β -estradiol (E₂) na camada granulosa do folículo ovariano. O E₂ é o principal esteroide produzido na fase de maturação gonadal nas fêmeas e está associado com a proliferação das oogônias, bem como estimula a produção de vitelogenina pelo fígado. A vitelogenina é transportada pela corrente sanguínea e captada pelos oócitos, mediante ação do Fsh (LUBZENS et al., 2010). O crescimento do oócito se dá pela incorporação de vitelo, o

principal substrato metabólico para o desenvolvimento inicial dos peixes. O início da vitelogênese é caracterizada pelo aumento nos níveis plasmáticos de Fsh, E_2 e na expressão de *fshr* (LUBZENS et al., 2010).

Os altos níveis de E_2 induzem a secreção de Lh, o qual estimula a síntese de 17α -hidroxiprogesterona nas células tecais. Esta é convertida pela enzima 20β -HSD presente nas células da granulosa em 17α - 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-one (DHP). O DHP é o esteroide indutor da maturação final (MIS) na maioria dos teleósteos (YARON; LEVAVI-SIVAN, 2011), mas também promove a entrada das oogônias em meiose durante as fases iniciais do desenvolvimento ovariano (LUBZENS et al., 2010).

Nos machos, os esteroides sexuais predominantes são a T e a 11-cetotestosterona (11-KT). A T é hidroxilada e depois oxidada pela enzima 11β -HSD, resultando em 11-KT, o andrógeno mais potente entre os teleósteos. Ambos andrógenos são produzidos pelas células de Leydig e atuam no processo de maturação gonadal e nas características sexuais nos machos. Os níveis de T e 11-KT aumentam gradualmente durante a gametogênese e decrescem durante a espermiacção (SCHULZ et al., 2010).

Embora encontrado em baixas concentrações plasmáticas, o E_2 também é importante no processo de espermatogênese. Sob estimulação das gonadotropinas, especialmente o Fsh, o E_2 é secretado pelas células de Leydig e, ao ligar-se ao seus receptores presentes nas células de Sertoli, estimula a secreção do fator de renovação das espermatogônias tronco, o qual efetivamente estimulará a proliferação espermatogonial por mitose (YARON; LEVAVI-SIVAN, 2011). Por outro lado, a secreção de 11-KT pelas células de Leydig estimulará, nas células de Sertoli, a produção de vários fatores de crescimento como a activina B, o fator de crescimento do tipo insulina 1 (IGF1) e o hormônio anti-Mulleriano (AMH). A activina B e o IGF 1 estimulam a diferenciação espermatogonial, ao passo que o AMH inibe esse processo (SCHULZ et al., 2010).

Ainda, o início da divisão meiótica que resulta na formação das espermátides é induzida pelo DHP, o qual é produzido pelas próprias células germinativas do testículo e atua de forma parácrina/autócrina. Os maiores níveis plasmáticos de DHP são encontrados

durante o processo de maturação final dos espermatozoides, no qual estimula a espermição, aumenta a produção de sêmen e estimula a mobilidade dos espermatozoides (SCHULZ et al., 2010).

A maioria dos estudos sobre as flutuações dos níveis de esteroides sexuais são oriundas de espécies de clima temperado, mas existem alguns poucos estudos realizados em espécies sul-americanas como em *Cichlasoma dimerus* (Perciformes)(BIRBA et al., 2015), *Hoplias malabaricus* (Characiformes)(GOMES et al., 2015), *Odonthestes bonariensis* (Atheriniformes) (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2014), *Piaractus mesopotamcus* (Characiformes) (GAZOLA et al., 1996; GAZOLA; BORELLA, 1997), *Rhamdia quelen* (Siluriformes) (BARCELLOS et al., 2001), e em *Salminus hillari* (Characiformes) (MOREIRA et al., 2015).

1.8 Espermatogênese nos teleósteos

Na maioria dos teleósteos, os testículos são órgãos pares, alongados e aderidos à região dorsal da cavidade celomática pelo mesórquio. Ambos os testículos se juntam caudalmente, convergindo em um ducto eferente central, o qual chega ao exterior pelo poro urogenital (GRIER; ARANZÁBAL, 2009). As funções dos testículos são conservadas entre os vertebrados, como produzir gametas masculinos, os espermatozoides, por um processo chamado de espermatogênese; transportar estes gametas para o meio externo, e produzir hormônios esteroides sexuais (PUDNEY, 1995).

Os testículos apresentam dois compartimentos, o compartimento intertubular ou intersticial e o epitélio germinativo ou seminífero. Estes se encontram separados por uma membrana basal. O tecido intersticial é composto pelo tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas, fibras colágenas, células de defesa, células musculares lisas e, ainda, um tipo celular produtor de esteroides, as células de Leydig (GRIER; ARANZÁBAL, 2009).

Já o epitélio germinativo é formado por células somáticas e germinativas. Estas últimas incluem todos os estágios de diferenciação das células espermatogênicas:

A schematic diagram of the developing mouse ovary. The diagram shows the following components:

- SZ**: Surface zona cells, represented by black dots on wavy lines.
- L**: Luteal phase, the yellow background area.
- GC**: Granulosa cells, shown as a cluster of blue circles.
- SC**: Stratum compactum, the outer layer of the granulosa cell cluster.
- SE**: Stroma, represented by small red oval cells.
- IC**: Interstitial cells, located near the basement membrane.
- BV**: Blood vessel, shown as a cluster of red cells.
- BL**: Basement layer, the red line separating the ovary from the underlying structures.
- MY**: Myometrium, the muscle layer below the basement layer.
- LE**: Luteal phase, the yellow area at the bottom right.
- SGA**: Secondary granulosa cell cluster, shown as a cluster of green circles.
- SE**: Stroma, represented by small red oval cells.
- SGB**: Secondary granulosa cell cluster, shown as a cluster of green circles.

Figura 4 – Representação da espermatogênese cística em teleósteos. Compartimento germinativo (GC), compartimento intertubular (IC), vasos sanguíneos (BV), células de Leydig (LE), lâmina basal, células mióides peritubulares (MY), células de Sertoli (SE), espermatogônia do tipo A (SGA), espermatogônia do tipo B (SGB), espermátocitos (SC), espermatozoides (SZ) e lúmen tubular (L). Adaptado de Nóbrega et al., (2009).

Como resultado de citocineses incompletas, as células resultantes das sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias são mantidas conectadas por pontes citoplasmáticas. Desta forma, as células de Sertoli que envolvem cada cisto estão em contato com um clone de células germinativas na mesma etapa da espermatogênese, sendo esta a principal diferença da espermatogênese não-cística observada em mamíferos, répteis e aves. Uma vez que na espermatogênese não-cística as células de Sertoli em estão contato com células germinativas em diferentes estágios ao mesmo tempo. (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009; SCHULZ et al., 2010).

No final da espermatogênese cística, o cisto é rompido e seu lúmen torna-se contínuo com o túbulo seminífero, processo denominado de espermição (Figura 4). Assim, os espermatozoides formados são liberados em meio ao líquido seminal, também produzido pelas células de Sertoli. Entretanto, em algumas espécies, o cisto é rompido um período anterior e ocorre a liberação de espermátides para o túbulo seminífero. Deste modo, o processo de espermiogênese ocorre fora do cisto (no lúmen testicular) e este tipo de espermatogênese é denominada de semi-cística (GRIER; ARANZÁBAL, 2009).

A espermatogênese é sustentada pelas espermatogônias, células diploides que proliferam por rápidas divisões mitóticas sucessivas, aumentando o número de células germinativas dentro do epitélio germinativo. Atualmente considera-se que as espermatogônias do tipo A são as células-tronco, responsáveis pela autorrenovação deste tipo celular, ao passo que as espermatogônias do tipo B são comprometidas com a diferenciação em espermatozoides (SCHULZ et al., 2010). Adicionalmente, diferentes tipos de espermatogônia do tipo A e B podem ser reconhecidas segundo critérios morfológicos e fisiológicos, ver Schulz et al. (2010).

Uma vez que as espermatogônias duplicam seus cromossomos e iniciam a meiose, passam a ser chamadas de espermatócitos primários. Estes podem ser identificados por seu tamanho grande e pelos diferentes padrões de coloração nuclear, devido à progressiva condensação dos cromossomos (SCHULZ et al., 2010). Após o pareamento dos cromossomos homólogos e sua separação, passam a ser considerados espermatócitos secundários. Estes, resultantes da meiose I, são raramente observados, uma vez que rapidamente entram na meiose II. Os espermatócitos secundários são células pequenas, com um núcleo denso e geralmente encontrado junto a figuras metafásicas (SCHULZ et al., 2010). Ao concluir a meiose II, tornam-se espermátides, esféricas e haploides.

A seguir, as espermátides, entram em um processo denominado espermiogênese, o qual resultará na formação de espermatozoides. Neste processo ocorrem mudanças morfológicas e funcionais drásticas, como a condensação nuclear, formação do flagelo e perda do volume citoplasmático, capacitando o espermatozoide formado a reconhecer e fertilizar o oócito próprio de sua espécie (NÓBREGA, BATLOUNI, FRANÇA, 2009).

1.9 Oogênese nos teleósteos

Os ovários, na maioria dos teleósteos, são órgãos pares, alongados, saculares, com um lúmen central. São revestidos por uma túnica conjuntiva, a qual promove sua fixação na região dorsal da cavidade celomática. A região posterior de cada ovário é prolongada por um oviduto conectado à papila urogenital (JALABERT, 2005). Ainda, são compartimentados por lamelas de tecido conjuntivo que partem da periferia do ovário em direção ao seu interior. Estas lamelas são recobertas por células germinativas, constituindo assim o epitélio germinativo ovariano (GRIER; ARANZÁBAL; PATINO, 2009). O epitélio germinativo repousa sobre uma membrana basal, a qual divide o ovário em dois compartimentos: (a) o epitélio germinativo, formado por células somáticas epiteliais e escassas oogônias e oócitos iniciais individuais ou pequenos grupos; (b) o estroma, que apresenta diversos tipos celulares como fibroblastos, células mesenquimais, granulócitos,

assim como fibras colágenas, elásticas, reticulares e vasos sanguíneos (GRIER; ARANZÁBAL; PATINO, 2009).

Oogênese é o processo morfológico e funcional pelo qual as oogônias se tornam oócitos aptos à fecundação (GRIER; ARANZÁBAL; PATINO, 2009). Ela pode ser dividida nas seguintes etapas: proliferação oogonial, crescimento primário, estágio alvéolo cortical, crescimento secundário ou vitelogênese, maturação e ovulação (MCMILLAN, 2007), Figura 5.

Figura 5 – Esquema representativo da oogênese, foliculogênese e ovulação no teleosteo marinho *Sciaenops ocellatus* (Perciformes). A linha vermelha corresponde à membrana basal, a qual separa o epitélio germinativo do estroma ovariano. O processo de foliculogênese se inicia com individualização das oogônias pelas células foliculares. Com a ocorrência do crescimento primário e posterior vitelogênese, os oócitos aumentam de diâmetro e ao final deste processo estão aptos à maturação final. Após a ovulação, os oócitos são liberados no lúmen ovariano e os componentes remanescentes do complexo folicular formam o complexo pós-ovulatório. Esta

espécie apresenta ovos pelágicos, sendo a gota de lipídeo representada como um círculo branco dentro do oócito. Adaptado de Grier (2012).

Inicialmente ocorre a proliferação das oogônias, renovando assim a população de oócitos jovens e folículos a cada ciclo reprodutivo. Quando as oogônias são recrutadas para meiose, elas se tornam oócitos primários (LE MENN; CERDÀ; BABIN, 2007). Nesta etapa, os oócitos apresentam-se agrupados e seu desenvolvimento está ligeiramente sincronizado. Entretanto, eles tornam-se progressivamente isolados com o decorrer da foliculogênese (GRIER; ARANZÁBAL; PATINO, 2009). Esse isolamento é feito pelas células pré-foliculares que começam a circundar oócitos individuais, formando uma estrutura denominada folículo ovariano (McMILLAN, 2007), Figura 5.

A foliculogênese termina quando os oócitos estão completamente revestidos por uma membrana basal, a qual separa os folículos do epitélio germinativo. Com o início do crescimento primário, cada folículo ovariano torna-se revestido pela teca, uma camada celular originada das células presentes no estroma ovariano (Figura 5). Assim, ocorre a adição de uma nova camada celular ao redor da membrana basal, constituindo assim o complexo folicular ovariano. Neste complexo folicular, a teca torna-se mais complexa e pode ser dividida em teca interna e externa (GRIER; ARANZÁBAL; PATINO, 2009).

Continuando o crescimento primário, observa-se histologicamente o início da basofilia citoplasmática devido à intensa síntese e acúmulo de diversos RNAs maternos, e pelo aumento do volume do oócito, diminuindo assim a razão núcleo citoplasma. Ao final desta fase os oócitos e as células foliculares já estabeleceram uma relação íntima, a zona pelúcida encontra-se em formação, e as células foliculares e da teca se multiplicam, tornando estas camadas mais espessas (McMILLAN, 2007).

O estágio alvéolo cortical é caracterizado pelo aparecimento de estruturas como os alvéolos corticais, zona pelúcida com camadas distintas e gotas de lipídeos, sendo esta última apenas em espécies marinhas. A seguir, tem início o crescimento secundário ou vitelogênese, caracterizado pela deposição de uma grande quantidade de glóbulos de vitelo

no citoplasma dos oócitos. Com a contínua deposição de vitelo, os oócitos alcançam seu maior diâmetro antes da maturação, estando assim aptos ao processo de maturação (Grier et al., 2009). Até este momento, os oócitos encontram-se estacionados no estágio de diplóteno da prófase I (LUBZENS et al., 2010).

Após a vitelogênese, os oócitos entram na etapa de maturação final, caracterizada pelo retorno da divisão meiótica, bem como acontece uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos (LUBZENS et al., 2010). Nesta fase os folículos estão capacitados a responder ao hormônio indutor da maturação final. O núcleo celular (vesícula germinativa) tona-se excêntrico migrando para a periferia do citoplasma no polo animal. Ao final, ocorre o término na primeira divisão meiótica e o oócito, nesta etapa, fica estacionado na metáfase da segunda divisão meiótica (LE MENN, 2007).

Durante a ovulação, ocorre o rompimento de todas as camadas do entorno do oócito com a dissociação das junções celulares entre as células da camada da teca e da folicular, bem como a desestruturação da membrana basal, e os oócitos são liberados no lúmen ovariano. As estruturas foliculares remanescentes (células foliculares, membrana basal e teca) formam os complexos pós-ovulatórios (Figura 5), os quais serão fagocitados e reabsorvidos. Ainda, a atresia folicular, um processo degenerativo e de remoção de restos celulares, é frequentemente observado em folículos vitelogênicos e maduros ao final do período reprodutivo (GRIER et al., 2009).

Nos teleósteos são encontrados três tipos de desenvolvimento ovariano: (a) sincrônico, no qual todos os oócitos desenvolvem e são ovulados ao mesmo tempo; (b) sincrônico em grupo, em que pelos menos duas populações distintas de oócitos são identificadas ao mesmo tempo; e, (c) assincrônico, em que oócitos em todos os estágios de desenvolvimento estão presentes, sem uma população dominante (LOWERRE-BARBIERI et al., 2011).

Ainda, os padrões de ovulação podem variar. Espécies com desova total liberam os oócitos em um único episódio do ciclo de vida ou ao longo de um ciclo reprodutivo, ao passo que espécies com desova parcelada, uma parcela dos oócitos são recrutados ao processo

de maturação final e ovulação, a partir de uma população de oócitos vitelogênicos, em diferentes etapas ao longo da estação reprodutiva (LOWERE-BARBIERI et al., 2011; LUBZENS et al., 2010).

1.10 Fases reprodutivas

Ao longo do ciclo reprodutivo, sobre influência de diferentes classes de hormônios, os testículos e ovários podem sofrer alterações em seu tamanho, peso e espessura. Estas alterações são refletidas no índice gonadosomático (IGS) e são o resultado da remodelação tecidual que ocorre durante os processos de proliferação e diferenciação das células germinativas, liberação dos gametas e preparo para um novo ciclo reprodutivo (LUBZENS et al., 2010; SCHULZ et al., 2010).

A maioria dos teleósteos apresenta um ciclo reprodutivo anual bem definido. Ao longo deste período, a morfologia do epitélio germinativo dos testículos e ovários apresentam alterações estruturais, refletindo uma reprodução sazonal. Estas variações morfológicas têm sido utilizadas para a descrição de fases reprodutivas.

Segundo revisão por Brown-Peterson et al., (2011), diferentes terminologias para as fases reprodutivas e múltiplos termos para um mesmo aspecto tem sido reportados em diferentes espécies, acarretando uma dificuldade de entendimento dos resultados nos diferentes grupos de peixes. Nesse contexto, estes autores publicaram uma terminologia padronizada para a descrição do desenvolvimento reprodutivo nos peixes, como fruto da discussão realizada no Third Workshop on Gonadal Histology of Fishes, realizado em New Orleans, Louisiana, em 2006.

Neste trabalho optamos por adotar a terminologia proposta por Brown-Peterson et al., (2011), em que o termo fase é usado para indicar o desenvolvimento gonadal, ao passo que o termo estágio indica os eventos que ocorrem durante a gametogênese. Durante a gametogênese são reconhecidos os estágios: espermatogônia, espermatócitos, espermátides e espermatozoides. Já na oogênese, são observados os seguintes estágios: oócitos em crescimento primário, oócitos alvéolo corticais, oócitos em vitelogênese, oócitos

em maturação final, ovulação e atresia (BROWN-PETERSON et al., 2011). A partir de caracteres histológicos e fisiológicos, são reconhecidas cinco fases: imaturo, desenvolvimento, apto à reprodução, regressão e regeneração.

A fase imaturo é identificada em animais que nunca reproduziram. Nestes, os testículos são pequenos, geralmente transparentes e filiformes. Somente espermatogônias do tipo A estão presentes e não existe lúmen nos lóbulos testiculares. Os ovários são pequenos, geralmente de cor clara, e os vasos sanguíneos não são distinguíveis. São encontrados apenas oogônias e oócitos em crescimento primário. A parede ovariana é delgada e existe pouco espaço entre os oócitos (BROWN-PETERSON et al., 2011).

Na fase de desenvolvimento, os testículos são pequenos, mas facilmente identificados. Os cistos são evidentes ao longo dos lóbulos e podem apresentar espermatogônias do tipo B, espermatócitos primários e secundários, bem como espermatozoides. O epitélio germinativo é contínuo. Também pode ser observada a subfase de desenvolvimento inicial, caracterizada pela presença de apenas espermatogônias do tipo A, espermatogônias do tipo B e espermatócitos primários. Com relação aos ovários, estes estão aumentados, os vasos sanguíneos são reconhecidos, podem ser detectados oócitos em crescimento primário, oócitos alvéolo-corticais e em vitelogênese, bem como folículos atresícos também podem estar presentes. Também existe a subfase de desenvolvimento inicial, em que são detectados apenas oócitos em crescimento primário e oócitos alvéolo-corticais (BROWN-PETERSON et al., 2011).

Na fase apto à reprodução, o animal já completou o desenvolvimento gonadal e está fisiologicamente preparado para reproduzir. Os testículos são grandes e firmes, e os espermatozoides são detectados no lúmen dos lóbulos ou nos ductos espermáticos. Todos os estágios da espermatogênese podem ser observados, assim como a presença de cistos ao longo de todo o testículo. O epitélio germinativo pode ser contínuo ou descontínuo. Com relação aos ovários, nesta fase, são grandes, com vasos sanguíneos proeminentes. Os oócitos individuais podem ser identificados macroscopicamente, e pode-se observar a presença de oócitos em vitelogênese tardia e folículos pós-ovulatórios em espécies com

múltiplas desovas. Também podem ser observados oócitos vitelogênicos em atresia e estágios iniciais da maturação final dos oócitos. Adicionalmente, existe a subfase ativamente apto à desova, caracterizada pela detecção de oócitos apresentando migração e quebra da vesícula germinativa, ou ovulação (BROWN-PETERSON et al., 2011).

A seguir, na fase de regressão, os testículos são pequenos e flácidos, podem ser detectados espermatozoides residuais no lúmen dos lóbulos e ductos espermáticos. Também são observados cistos muito espalhados próximos à periferia, apresentando espermátócitos secundários, espermátides e espermatozoides. Também ocorre a proliferação das espermatogônias e regeneração do epitélio germinativo na periferia dos testículos. Quanto aos ovários, na fase de regressão, são flácidos, e os vasos sanguíneos continuam proeminentes. São detectados atresia e folículos pós-ovulatórios. Alguns oócitos alvéolos corticais e/ou vitelogênicos também estão presentes (BROWN-PETERSON et al., 2011).

Por último, na fase de regeneração, os animais são sexualmente maduros, mas sexualmente inativos. Os testículos são pequenos e não apresentam cistos, bem como geralmente não apresentam lúmen nos lóbulos. Apresentam ativa proliferação espermatogonial ao longo de todo o testículo e o epitélio germinativo é contínuo. Ocasionalmente podem ser observados pequenos acúmulos de espermatozoides. Os ovários são pequenos, apresentam vasos sanguíneos de menor calibre. Somente oogônias e oócitos em crescimento primários são detectados. Também podem ser observados vasos sanguíneos proeminentes, parede ovariana espessa e folículos pós-ovulatórios em atresia (BROWN-PETERSON et al., 2011).

1.11 Disfunções reprodutivas em cativeiro

A piscicultura brasileira é caracterizada pela diversidade de espécies cultivadas. Dentre estas, a maioria realiza migrações reprodutivas em seu ambiente natural (GODINHO, 2007) e quando em confinamento, muitas apresentam disfunções reprodutivas, inviabilizando parcial ou totalmente o processo reprodutivo em cativeiro (ALMEIDA, 2013).

As disfunções reprodutivas são um fenômeno muito comum na aquicultura. Segundo revisão por Mylonas et al. (2010), esses problemas são menos severos nos machos, como a ocorrência de sêmen em pouca quantidade ou de baixa qualidade. Já nas fêmeas, são observados problemas mais severos desde a vitelogênese até a desova (MYLONAS et al., 2010). A maioria das espécies consegue concluir o processo de gametogênese em cativeiro, mas não consegue atingir os eventos finais do processo reprodutivo, como a maturação final dos oócitos e ovulação nas fêmeas e a espermiacção nos machos.

Estas falhas reprodutivas são atribuídas à possível ausência dos altos níveis de Lh neste período (MYLONAS; ZOHAR, 2001), mas causas reais que culminam nestes problemas observados em cativeiro ainda são pouco conhecidas em espécies sul-americanas, especialmente a regulação hormonal envolvida (HAINFELLNER et al., 2012b). Para contornar tais problemas tem-se recorrido à terapias hormonais, que utilizam a aplicação de hormônios exógenos, sintéticos ou heterólogos, como o extrato bruto de hipófise, análogos de GnRH, agonistas de GnRH, inibidores de dopamina, hCG e, mais recentemente, gonadotropinas sintéticas (MYLONAS et al., 2010). Ao atingirem a hipófise ou as gônadas, estes hormônios exógenos ativam a cascata hormonal e as vias de sinalização celulares decorrentes que promovem a maturação final dos gametas, de forma a viabilizar o fornecimento de gametas viáveis para o processo de fertilização. Mas este só é alcançado quando o processo de gametogênese foi concluído com sucesso, em uma etapa anterior ao processo de desova (ALMEIDA, 2013).

Entretanto, nem todas as espécies respondem com sucesso às diferentes opções de indução hormonal, acarretando prejuízos em todos os setores envolvidos na cadeia produtiva da piscicultura (ALMEIDA, 2013; GODINHO, 2007). Por exemplo, Hainfellner et al. (2012a) relataram que fêmeas de *Brycon amazonicus* (Characiformes) induzidas por extrato bruto de hipófise alcançaram a maturação final dos oócitos mas não ovularam, ficando os óocitos retidos nos ovários. Embora as causas fisiológicas não fossem investigadas, estes autores atribuíram essa disfunção a ineficiência da terapia hormonal utilizada.

Outro estudo, em fêmeas de *Prochilodus argenteus* (Characiformes) submetidos a diferentes temperaturas durante o processo de reprodução induzida, mostrou que, uma parte dos animais não ovulou e ainda apresentou fecundidade e diâmetro dos oócitos vitelogênicos reduzidos, em paralelo a baixos níveis de E_2 e 17α -OHP, culminando com um atraso no processo de maturação final e prejuízos na ovulação e desova (ARANTES et al., 2011).

Alguns estudos também têm reportado disfunções reprodutivas durante o processo de gametogênese em espécies nativas. Em *Prochilodus lineatus* (Characiformes), foi observado que fêmeas cultivadas em alta densidade em tanques-rede apresentaram níveis reduzidos de E_2 e um atraso no processo de vitelogênese, culminando com um baixo desempenho reprodutivo quando comparadas àquelas criadas em tanques escavados (HAINFELLNER et al., 2012a). Ainda, Honji et al., (2003) verificaram que fêmeas de *Salminus hilarii* (Characiformes) mantidas em cativeiro não atingiram a maturação final, apresentaram um elevado número de oócitos atrésicos, os oócitos eram maiores e a fecundidade absoluta foi menor, em comparação aos animais em ambiente natural (HONJI et al., 2003).

Adicionalmente, foi investigado o funcionamento do eixo reprodutivo nestes animais, verificando que em cativeiro as fêmeas apresentam menores níveis de *fshb* durante todo o ciclo reprodutivo (MOREIRA et al., 2015). Ainda, os níveis de 17α -OHP e $17\alpha,20\beta$ -DHP foram constantes ao longo do ciclo reprodutivo, sendo sugerido que os problemas anteriormente observados estariam associados a alterações na síntese de gonadotropinas e dos esteroides sexuais (MOREIRA et al., 2015).

Em relação aos machos, De Souza et al. (2015) reportaram que reprodutores *Prochilodus lineatus* (Characiformes) mantidos em tanques-rede, assim como as fêmeas, também tiveram o desenvolvimento gonadal afetado, apresentando índice gonadossomático reduzido e o sêmen produzido tinha baixa qualidade, o que por sua vez resultou em baixas taxas de fertilização e de eclosão das larvas.

Frente à diversidade de espécies nativas utilizadas na piscicultura brasileira, os estudos que reportam as disfunções reprodutivas nestas espécies ainda são insipientes, especialmente aqueles que analisam as diferentes classes de hormônios que regulam o processo reprodutivo. Desta forma, uma avaliação completa da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas durante o ciclo reprodutivo em cada espécie se faz necessária para o esclarecimento das causas fisiológicas de tais disfunções, possibilitando o desenvolvimento de protocolos alternativos que tornem mais eficiente a reprodução das espécies nativas em cativeiro.

1.12 Espécie modelo: *Astyanax altiparanae*

Astyanax altiparanae (GARUTTI; BRITSKI, 2000), popularmente conhecido como lambari-do-rabo-amarelo ou tambuí (Fig. 6), é um teleósteo pertencente à Ordem dos Characiformes e à Família Characidae, a qual está distribuída amplamente pela Bacia do alto rio Paraná (NAKATANI et al., 2001).

Figura 6 – Macho (A) e fêmea (B) adultos de *A. altiparanae*. Escala: 2 cm.

Apresenta hábito alimentar onívoro e crescimento rápido, atingido a primeira maturação sexual com cerca de quatro meses de vida em cultivo (Porto-Foresti et al., 2001), com 69 mm de comprimento total. Os machos apresentam nadadeira anal áspera ao toque e as fêmeas geralmente apresentam maiores proporções. A diferenciação de seu embrião inicia-se com 8 horas após a fecundação (hpf) e as larvas eclodem com 24 hpf, à 26 °C (NAKATANI et al., 2001).

Devido ao fácil cultivo, o lambari tem sido amplamente utilizado para consumo, tanto *in natura* como industrializado na forma de conservas, na própria piscicultura, como alimento para peixes carnívoros, e ainda como isca viva para a pesca esportiva (PORTO-FORESTI et al., 2005). Adicionalmente, esta espécie apresenta importância ecológica, uma vez que participa de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos brasileiros.

Uma vez que apresenta pequeno porte e exigências mínimas para o cultivo, além de ser prolífera e atingir rapidamente a primeira maturação sexual (NAKATANI et al., 2001), tais características credenciam o lambari como uma espécie vantajosa para ser utilizada como modelo biológico em relação a outros Characiformes, bem como entre outras espécies utilizadas na piscicultura brasileira. Desta forma, o lambari tem sido utilizado cada vez mais como modelo biológico nas mais variadas áreas de pesquisa, como reprodução, fisiologia, ecotoxicologia, genética e nutrição. Ainda, *Astyanax altiparanae* foi considerado como um importante bioindicador dos ambientes aquáticos brasileiros, como apresentado no I Workshop do Grupo de Pesquisas sobre Efeitos de Xenobióticos na Ictiofauna Brasileira (2008).

Em relação à sua biologia reprodutiva, *Astyanax altiparanae* apresenta desenvolvimento ovariano assincrônico, desova múltipla, espermatogênese semi-cística, fecundação externa (CHEHADE; CASSEL; BORELLA, 2015; COSTA et al., 2013). Seu período reprodutivo ocorre principalmente no verão e pode realizar pequenas migrações reprodutivas. Quando mantido em cativeiro, geralmente é incapaz de reproduzir naturalmente sem indução hormonal ou outro tipo de manipulação (CHEHADE, 2015; FELIZARDO et al., 2012, NAKATANI et al., 2001). Entretanto, ainda faltam informações básicas sobre a regulação endócrina da sua reprodução em ambiente natural ou em cativeiro.

Nos últimos anos, o lambari tornou-se alvo de investigação no Laboratório de Endocrinologia de Peixes, ICB-USP e, desde então, vários estudos têm sido desenvolvidos abordando diferentes aspectos celulares, moleculares e hormonais do eixo hipotálamo-

hipófise-gônadas nesta espécie. Nosso grupo já caracterizou parcialmente a distribuição de GnRH no encéfalo (GOMES; COSTA; BORELLA, 2013), bem como isolou e caracterizou os cDNAs para *gnrh2* e *gnrh3*, analisou a expressão temporal destes transcritos ao longo do estímulo reprodutivo e suas funções biológicas (CHEHADE, 2015). Também foi caracterizada a morfogênese da hipófise e a cronologia do aparecimento das células adeno-hipofisárias (BRANCO, 2015).

Em relação às gônadas, foram descritas as alterações histológicas e ultraestruturais durante sua espermatogênese semi-cística (COSTA et al., 2014) e a caracterização das espermatogônias-tronco e dos nichos espermatogoniais (CAMARGO, 2015). Adicionalmente, foram clonados e caracterizados os genes *dmrt1* e *sox9* e o envolvimento destes na diferenciação testicular e na espermatogênese (ADOLFI et al., 2015). Também, recentemente foram clonadas sequências parciais do cDNAs das principais enzimas envolvidas na esteroidogênese gonadal (JESUS et al., comunicação pessoal). Quanto aos ovários, Chehade, Cassel e Borella (2015) caracterizaram a dinâmica ovariana durante a reprodução induzida pela redução do nível de água, bem como um estudo detalhado da dinâmica da oogênese durante o ciclo reprodutivo em cativeiro encontra-se em fase de desenvolvimento por Cassel et al. (em elaboração).

Visando o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas nesta espécie, alguns estudos relacionados à reprodução de *Astyanax altiparanae* foram recentemente publicados, como o estabelecimento de um protocolo para supressão de sua espermatogênese endógena pela manipulação da temperatura ou com o uso de fármaco (SIQUEIRA-SILVA et al., 2015) e algumas abordagens para melhorar a qualidade do sêmen e o armazenamento de gametas de ambos os sexos a curto prazo (YASUI et al., 2015).

Estes dados recentemente publicados sobre *Astyanax altiparanae* têm esclarecido alguns aspectos básicos sobre a fisiologia reprodutiva desta espécie, bem como chamam atenção para a necessidade de investigar de forma mais aprofundada os aspectos moleculares, celulares e fisiológicos que regulam sua reprodução. Deste modo, amplia-se a

compreensão sobre a biologia e endocrinologia de espécies da Ordem Characiformes e, ainda, estes dados podem subsidiar novas e mais eficazes melhorias na aquicultura.

Nesse contexto, ressaltamos a necessidade da caracterização dos demais hormônios e receptores que compõe o eixo HPG nesta espécie, bem como compreender como esses elementos atuam nas diferentes fases do ciclo reprodutivo, em ambiente natural, em cativeiro, ou em diferentes condições experimentais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Caracterizar a estrutura molecular e a expressão espaço-temporal das gonadotropinas e seus receptores em *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro, bem como as implicações destes no controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a clonagem e a caracterização molecular dos cDNAs para *gpha*, *fshb*, *lhb*, *fshr* e *lhr* de *A. altiparanae*.
- Analisar filogeneticamente as sequências de aminoácidos deduzidas para Gpha, Fshb, Lhb, Fshr e Lhr.
- Avaliar a expressão dos genes *gpha*, *fshb*, *lhb*, *fshr* e *lhr* em diferentes órgãos.
- Identificar quais tipos celulares expressam as subunidades das gonadotropinas na hipófise, bem como dos receptores de gonadotropinas nas gônadas.
- Analisar os perfis de expressão gênica hipofisários para *gpha*, *fshb*, *lhb* e gonadais para *fshr* e *lhr* durante o ciclo reprodutivo anual em machos e fêmeas em cativeiro.
- Quantificar os níveis plasmáticos de testosterona, 11-ceto-testosterona, 17 β -estradiol e 17 α -hidroxiprogesterona durante o ciclo reprodutivo anual de machos e fêmeas em cativeiro.
- Relacionar os níveis de expressão gênica das gonadotropinas e seus receptores bem como os níveis plasmáticos de esteroides gonadais com a cinética da gametogênese.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e coleta de material biológico

Todos os espécimes de *A. altiparanae* utilizados neste estudo foram criados e coletados na Estação de Aquicultura da Companhia Energética do Estado de São Paulo, localizada na cidade de Paraibuna, SP, Brasil (23°24'51"S, 45°35'59"W). Dos animais utilizados, alguns exemplares (*Voucher* espécimes) foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, com o número MZUSP 113746.

Vinte fêmeas adultas (peso médio de 27 g) foram coletadas em Março de 2012, tendo a hipófise removida segundo os procedimentos descritos abaixo. Estas foram agrupadas em 4 *pools* (n=5) para serem utilizadas na clonagem molecular das gonadotropinas.

Para as análises ao longo do ciclo reprodutivo, havia a necessidade da utilização de animais com a mesma idade. Para isso, um lote de 2000 alevinos, com seis meses de vida, obtido em uma reprodução realizada no mês de fevereiro de 2012, foi alocado em um tanque de 200 m³ sob regime natural de fotoperíodo e temperatura, sendo alimentado duas vezes ao dia com ração comercial, segundo os procedimentos já estabelecidos na estação para a espécie em estudo. Este lote de animais foi reservado exclusivamente ao desenvolvimento deste trabalho. Em setembro de 2012 foi iniciado o experimento com os animais adultos, sendo amostrados mensalmente de forma aleatória 10 animais de cada sexo até o mês de julho de 2013, totalizando 12 coletas, para a coleta de diferentes órgãos e tecidos.

Em todas as coletas, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína 0,1% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e rapidamente foram mensurados os valores de peso total (PT), comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP). Imediatamente após, os animais foram eutanasiados pela ruptura da medula espinhal próximo ao opérculo. De forma paralela foi realizada a coleta da hipófise e das gônadas de cada animal. As hipófises foram cuidadosamente removidas após a exposição e arrebatamento do encéfalo em direção à

região cranial. Estão, foram imersas em tubos contendo RNAholder (Bioagency, São Paulo, SP, Brasil) e armazenadas em freezer a -80 °C, para posterior extração de RNA.

As gônadas (testículos e ovários) foram removidas da cavidade celomática, pesadas e posteriormente segmentadas, sendo que alguns fragmentos do terço médio de cada gônada foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) a 4 °C e mantidos desta forma até o início do processamento histológico. Um segundo grupo de fragmentos gonadais foi coletado e armazenado em RNAholder, visando a extração de RNA. Adicionalmente, o fígado de cada animal foi removido e pesado. Estes dados, juntamente com o peso das gônadas, foram utilizados para o cálculo dos Índices Hepatossomático [$HSI = (\text{peso do fígado} / \text{peso corporal}) \times 100$] e Gonadossomático [$GSI = (\text{peso da gônada} / \text{peso corporal}) \times 100$], respectivamente, segundo Vazzoler (1996).

O sangue de cada animal foi colhido por meio de seringas heparinizadas (seringa descartável de insulina com agulha 13 x 4,5), centrifugado a 3000 RPM por 5 min e, após a separação das fases, o plasma foi removido, aliquoteado em tubos e armazenado a -80 °C até a realização da quantificação dos esteroides sexuais.

Adicionalmente, em dezembro de 2012 foram coletados fragmentos de vários órgãos ou órgãos inteiros (encéfalo, hipófise, brânquia, fígado, estômago, intestino, bexiga natatória, rim cefálico, coração e músculo esquelético) de machos (n=3) e fêmeas (n=3), os quais foram preservados para extração de RNA, como já descrito. Nesta mesma coleta, 10 fêmeas adultas foram amostradas e tiveram as cabeças removidas e fixadas em diferentes soluções fixadoras com o intuito de investigar a expressão celular das gonadotropinas na hipófise. Destas fêmeas, cinco delas tiveram seus ovários coletados, fragmentados e fixados em Bouin Acético, bem como os testículos de cinco espécimes machos também foram coletados nesta ocasião e fixados da mesma forma, visando a imunolocalização dos receptores de gonadotropinas.

Todos os procedimentos experimentais adotados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, n.130/2011.

3.2 Extração de RNA total

A extração de RNA total dos fragmentos de diversos órgãos e *pools* de hipófise de *A. altiparanae* foi realizada com Trizol, na proporção de 1 ml para 100 mg de tecido. Cada fragmento de tecido foi homogeneizado com 1 ml de Trizol e incubado por 10 minutos a -4 °C (no gelo picado). A seguir, as amostras foram precipitadas com 160 µL de clorofórmio, incubadas no gelo por 15 min e, então, centrifugadas por 15 minutos a 12.000 g a 4 °C para a separação do RNA total e proteínas. A fase contendo o RNA total foi removida e precipitada com 400 µL de álcool isopropílico, com a adição de 0,5 µL de glicogênio, sendo as amostras mantidas a 4 °C por 18 horas para aumentar a precipitação do RNA. Então, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* foram lavados com 1 ml de etanol 75%, agitados e novamente centrifugados a 8.000 g, a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. Ao final, cada *pellet* de RNA foi ressuspensionado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), em volumes variáveis de acordo com o tamanho de cada *pellet*, sendo adicionado à solução 1 µL de RNaseout.

A extração de RNA de hipófises individuais, destinadas às reações de qPCR, foi realizada com o Kit RNAaqueous Micro Kit AMBION (AM1931, Ambion, Carlsbad, CA, USA), segundo as especificações do fabricante. Este kit realiza a extração de RNA e separação do RNA em colunas, e após vários testes com outros kits, revelou ser a melhor opção para extrair RNA da hipófise de *A. altiparanae*, gerando cerca de 800 a 1500 ng de RNA total por hipófise.

Após a extração do RNA, foi realizada a quantificação e análise da pureza do RNA total de cada amostra por meio de espectrofotômetro, na absorbância A_{260} , por meio da relação A_{260}/A_{280} (considerando-se uma relação 260/280 OD como satisfatória entre os valores de 1,8 e 2). Para verificação da integridade das amostras, parte de algumas amostras foram submetidas à eletroforese em gel denaturante de agarose 1%. Foram

consideradas íntegras aquelas que apresentassem as bandas ribossomais 18S e 28S intactas à visualização por transiluminação com luz ultravioleta após coloração com solução de brometo de etídeo. A seguir, as amostras satisfatórias aos critérios acima estabelecidos foram conservadas a -80 °C até a sua utilização nos diferentes métodos realizados neste trabalho.

3.3 Síntese de cDNA

Para a remoção de possíveis DNAs contaminantes, o RNA total extraído de cada amostra foi tratado com DNase *free* turbo Ambion, segundo as especificações do fabricante. O cDNA de cada amostra de RNA a ser utilizado nas reações de RT-PCR foi sintetizado por meio da incubação de 2000 ng de RNA total na presença de 250 ng de random *primer*, 10 mM de dNTP's e água ultrapura, em um volume total de 13 µL. Esta solução foi incubada a 65 °C por 5 min e em seguida em gelo mais água por 1 min, para a desnaturação das moléculas de RNA. Em seguida, foram adicionados 4 µL de tampão da enzima 5X, 1 µL de DTT, 0,5 µL de RNase *in*, 0,5 µL de SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e água ultrapura, finalizando um volume total de 20 µL em cada. Os tubos foram alocados no termociclador, seguindo a seguinte programação: 5 minutos a 25 °C, 1 h a 55 °C e 15 minutos a 70 °C em termociclador. Ao final deste processo, cada amostra de cDNA foi aliquoteada e mantida a -20 °C até o uso. A integridade do cDNA foi avaliada por meio de RT-PCR para amplificação do gene β -actina (5'→3', *Forward* CCATCTCCTGCTCGAAGTC, *Reverse* CACTGCCCATCTACGAG), que resultou na amplificação de produtos de tamanhos esperados para este gene de 193 pares de bases (pb). A partir de então, os cDNAs sintetizados foram destinados às reações de RT-PCR.

3.4 Clonagem molecular

Para a clonagem dos cDNAs completos das subunidades das gonadotropinas (*gpha*, *fshb* e *lhb*), dos receptores de gonadotropinas (*fshr* e *lhr*) e de um fragmento parcial do gene *elongation factor 1 alpha* (*ef1a*), utilizamos como estratégia inicial o desenho de

primers degenerados, listados na Tabela 1. Estes primers foram desenhados a partir de regiões conservadas das sequências nucleotídicas de espécies das ordens Siluriformes e Cypriniformes obtidas no GenBank, por meio do software de alinhamento Clustal X2 (<http://www.clustal.org/clustal2/>) (LARKIN et al., 2007).

Tabela 1 – Primers utilizados na clonagem de fragmentos dos cDNAs de diversos genes *A. altiparanae*.

Primer	Sequence 5'→3'
<i>gpha F1</i>	TGGVTGTGARGARTGYRAACTCAA
<i>gpha R1</i>	GTGCTRCARTGGCAGTCTGTG
<i>fshb F1</i>	AGYGASGARTGTGGCAGCT
<i>fshb R1</i>	CAYTCACAGCTSAGRGCCAC
<i>lhb F3*</i>	TCTSTGGAGAAGGADGGCT
<i>lhb R3*</i>	CGAWGGTRCAGTCGGANGTG
<i>elfa1 F1</i>	GAARGAAGCTGCGYAGATGGGCAAGGG
<i>elfa1 R1</i>	GTTGTAGCCGATCTTCTTGATGTATGCGCTGAC TTC
<i>fshr F_9</i>	TAYCTGACKATYTSMAACACDGGHCT
<i>fshr R_15</i>	GGYTTGGMRCAGARTTDATDGGGT
<i>lhr F_24</i>	GAYGCYTTYAAAYCCYTGYGARGA
<i>lhr R_30</i>	AAVGAGATSGGYGCCATGCA

* Originado de Parhar et al. (2003).

A seguir foram realizadas reações de RT-PCR para avaliar se os primers acima citados amplificariam os produtos de interesse. As condições específicas das reações de amplificação foram padronizadas a partir das condições padrão de RT-PCR: 1X *High Fidelity Buffer*; 0,5 mM de dNTP; 0,5 µg de cDNA; 1U de *Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (Invitrogen). Para isso, foi utilizado gradiente de temperatura de anelamento de 50 a 62 °C seguindo a ciclagem de 95 °C por 3 min, 95 °C por 30 seg, TA por 40 seg, 72 °C por 2 min, 72 °C por 7 min, por 35 ciclos.

Os produtos destas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo em tampão 1X Tris-Acetato-EDTA (TAE). O volume total de cada produto de PCR (25 µL) foi aplicado no gel juntamente com 5 µL de *loading buffer* 6X (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 100 V por 60 min e, a seguir, o gel foi analisado em transiluminador sob exposição à luz ultravioleta. Com o auxílio de uma lâmina, foram recortadas as bandas de interesse que apresentavam peso molecular próximo

ao produto esperado. As bandas extraídas foram purificadas com Kit *QIAEX II Extraction* (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Os produtos de PCR purificados foram inseridos no vetor de clonagem pGEM®T (Promega, Madison, WI, USA), Figura 7, por meio da enzima T4 DNA Ligase, conforme as especificações do fabricante.

Figura 7 – Estrutura do vetor de clonagem pGEM®T.

Em seguida, bactérias *Escherichia coli* foram transformadas por meio de choque térmico com as construções plasmidiais, semeadas em meio de cultura LB Agar e incubadas a 37 °C por 24 horas. Pelo menos 9 clones de cada construção plasmidial foram selecionados e a presença dos genes de interesse foi avaliada por PCR de colônia. Para esta técnica, os clones selecionados foram individualmente pinçados e homogeneizados em tubos contendo 50 µl de água ultrapura. Então, 1 µl desta solução foi utilizado como DNA molde para as reações de PCR, utilizando os primers SP6 E T7 fornecidos pelo fabricante, os quais flanqueiam os sítios de inserção dos fragmentos no vetor utilizado. Os clones positivos (que apresentaram produtos amplificados de tamanho próximo àqueles inicialmente detectados) foram expandidos em culturas líquidas em meio LB, durante 24 horas, a 37 °C e em agitação a 190 RPM. Parte de cultura líquida foi destinada a mini-preparações plasmidiais (mini-preps) com o Kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen).

Cada mini-prep foi destinado à reação de sequenciamento de DNA com o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®), segundo as recomendações do fabricante, e foram sequenciadas no Centro de Estudos do Genoma Humano – IB/USP. Os resultados de sequenciamento obtidos foram analisados utilizando-se a interface BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para a verificação de homologia com as sequências de outros teleósteos já existentes no GenBank.

3.4.1 Rapid amplification of cDNA ends (RACE 3' e 5')

A obtenção das extremidades 3' e 5' das sequências de cDNA investigadas neste estudo foi realizada com a utilização do kit *GeneRacer® Kit with SuperScript® III RT and TOPO TA® PCR Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. Para o ensaio de 5'RACE, 2000 ng de RNA total (hipófise ou gônadas) foi tratado com fosfatase alcalina (CIP) e, em seguida, tratada com pirofosfatase ácida (TAP). Um oligonucleotídeo de 44 bases (adaptador de RNA fornecido pelo fabricante) foi ligado à região 3' das moléculas de RNA e, em seguida, reações de transcrição reversa com *random* primers e com a enzima Super Script III permitiram a obtenção do cDNA. Por fim, reações de RT-PCR amplificaram a região 5' dos transcritos de interesse, com o uso de primers específicos para cada gene (Tabela 2) em conjunto do primer GeneRacer 5' fornecido pelo fabricante, o qual é complementar ao adaptador de 44 bases acoplado às moléculas de RNA tratadas.

Tabela 2 – Primers utilizados nas reações de RACE PCR.

Primer	Sequence 5'→ 3'
<i>gpha5 outer</i>	CTGTAGTTTTACATTGTTGACAAAAACCCTTTGGATT
<i>gpha3 outer</i>	CTCAAGGAGAACAGCATCTTCTCCAGACC
<i>fshb5 outer</i>	CTGCGCCGGCTTCTGCCACACGCAGGAA
<i>fshb3 outer</i>	GCCCGTCAGCTGGACAGTCTCGTATG
<i>lhb5 outer</i>	GACATTGCCTCACCAAGGATCCGGTGTA
<i>lhb3 outer</i>	GGTGACAGGCTACAGTCACAAGTGA
5'-RACE <i>fshr</i> #1	CAGGAAGGTGAAGCCCATGATGTCTCGCA
5'-RACE <i>fshr</i> #3	CTCCAGACTGGGTAACCATCTCAGAGAGTAGACGGAGGTG

3'-RACE <i>fshr</i> #4	TACTACAACCATGGCATCGACTGGCAGACCGG
3'-RACE <i>fshr</i> #5	CGGTCCTTGCCAGCGAGCTGTCTGTCTACAC
5'-RACE <i>lhr</i> #1	TCTGTGAAGATGAGCACTGCCATGCGCTTTGCGAT
5'-RACE <i>lhr</i> #2	AGCTCCACGTTAAAGAGCAGAAGGAGGATGATGTA
5'-RACE <i>lhr</i> #4483	AGYTTYGAYVGMCTGAAAGGWGTMAAAAGAATAGAA
5'-RACE <i>lhr</i> #4464	GGAGGACACGTCCAATATAGTAGGGCCCGATG
3'-RACE <i>lhr</i> #4	GATGTGTACCTGGCGTTTGCTGATTTCTGCA
3'-RACE <i>lhr</i> #5	CCGGCTGCGGCATCGCCGGATT
GeneRacer 5' <i>Primer</i>	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
GeneRacer 5' nested <i>Primer*</i>	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
GeneRacer 3' <i>Primer</i>	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
GeneRacer 3' nested <i>Primer*</i>	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG

Para o 3'RACE, o cDNA gerado na reação de 5'RACE foi submetido à reação de PCR usando os primers GeneRacer 3' (complementar à cauda poliA, fornecido igualmente pelo fabricante) e o primer específico para cada transcrito de interesse (Tabela 02). Uma vez amplificados, os fragmentos foram purificados, subclonados e sequenciados como anteriormente descrito. Ainda, tiveram a homologia conferida com o uso da interface BLAST e, a seguir, foram submetidos a diversas análises *in silico*.

3.5 Análises estruturais e filogenéticas

A nomenclatura das sequências de cDNAs e aminoácidos obtidas foi realizada seguindo as diretrizes apresentadas no banco de dados ZFIN (Zebrafish database, <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>). As sequências de aminoácidos foram deduzidas a partir das sequências de cDNAs com a ferramenta *on line* Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>). A predição do peptídeo sinal e do seu sítio de clivagem foi realizada com a ferramenta 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (PETERSEN et al., 2011). Os sítios de N glicosilação foram deduzidos usando a ferramenta NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), enquanto os pesos moleculares esperados foram calculados com a ferramenta Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/).

O alinhamento múltiplo foi realizado a partir das sequências completas de aminoácidos dos receptores de gonadotropinas de espécies de diversas ordens de teleósteos disponíveis no GenBank com o emprego da software Clustal X (<http://www.clustal.org/clustal2/>). As árvores filogenéticas foram construídas pelo algoritmo Neighbor-Joining com o uso do software Mega 6 (TAMURA et al., 2013). A robustez de cada árvore foi avaliada a partir de 1000 replicatas (bootstrapping). Como grupos externos (outgroup), foram utilizados a sequência da glicoproteína $\alpha 2$ (ACI87878) de *Petromyzon marinus* (lampreia do mar) para Gpha, enquanto a sequência da gonadotropina do tipo beta (AW56433) da mesma espécie foi usada na análises de Fshb e Lhb. As sequências do receptor de hormônio glicoproteico I (AY750688) e II do agnata *Petromyzon marinus* foram utilizadas como grupos externos (outgroup) para as árvores do Fshr e Lhr, respectivamente. Os números de acesso ao GenBank das sequências utilizadas nestas análises estão descritas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Número de acesso ao GenBank das sequências de aminoácidos para as subunidades das gonadotropinas usadas no alinhamento múltiplo e na análise filogenética.

Ordem	Espécie	Gpha	Fshb	Lhb
Anguilliformes	<i>Anguilla japonica</i>	BAD1430	Q9YGK3	BAD14302
	<i>Anguilla Anguilla</i>	P27794	AAN73407	AAL37629
Characiformes	<i>Astyanax altiparanae</i>	KJ544555	KJ544557	KJ544556
	<i>Astyanax mexicanus</i>	XP_007257486	XP_007247020	XP_007243865 XP_007243866
Siluriformes	<i>Clarias gariepinus</i>	P53542	AAN75753	P53543
	<i>Ictalurus punctatus</i>	NP001187007	Q9DG81	Q9D80
	<i>Silurus meridionalis</i>	AAY42268	AAY42270	AAY42269
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i>	AAR84285	NP991187	AAV31153
	<i>Carassius auratus</i>	BAA13112	BAA13530	BAA13531
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	P30983	ABM73669	AAM28896
	<i>Cyprinus carpio</i>	P30983	BAA20080	CAA42543
	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	ABU87327	ABQ42695	ABQ427151
Osteoglossiformes	<i>Arapaima gigas</i>	AIG51239		
Salmoniformes	<i>Salmo salar</i>	ACM08728	AAD34594	ACN10926
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	BAB17685	BAB17686	BAB17685
Gadiformes	<i>Gadus morhua</i>	ABD62882	DQ402373	DQ402374
Atheriniformes	<i>Odontesthes bonariensis</i>	ABD36561	AAP85606	AAP85607
Cyprinodontiformes	<i>Fundulus heteroclitus</i>	AAB60605	P30971	P30972
Scorpaeniformes	<i>Anoploma fimbria</i>	KC161996	KC161994	KC161996
	<i>Sebastes schlegelii</i>	AAU14140	AAU14141	AAU14142
Perciformes	<i>Discentrarchus labrax</i>	AAK49431	AAN40506	AAN40507
	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	ABQ96863	AAX18926	ABQ96864
	<i>Epinephelus coioides</i>	AAN18039	AAT79786	AAM28896
	<i>Oreochromis niloticus</i>	NP001266680	AAP49575	AAP49576
Pleuronectiformes	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAD10503	CAD10501	CAD10502
	<i>Solea senegalensis</i>	ABW81405	ABU95601	ABU95600
Primatas	<i>Homo sapiens</i>	NP000726	NP001018090	NP000885

Tabela 4 – Números de acesso ao GenBank das sequências de aminoácidos dos receptores de gonadotropinas usados no alinhamento múltiplo e na análise filogenética.

Ordem	Espécie	Fshr	Lhr
Characiformes	<i>Astyanax mexicanus</i>	XP_007250202.1	XP_007228830.1
	<i>Clarias gariepinus</i>	CAB51907.2	AAN75752.1
Siluriformes	<i>Ictalurus punctatus</i>	AAK16067.1	NP_001187208.1
	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	AEH84420.1	AEH16748.2
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i>	AAP33512.1	AAR84281.1
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	–	ABM73668.1
	<i>Labeo rohita</i>	–	AGK89799.1
	<i>Gobiocypris rarus</i>	AGI78913.1	AGI78914.1
Pleuronectiformes	<i>Hippoglossus hippoglossus 1</i>	ACB13177.1	ACB13176.1
	<i>Hippoglossus hippoglossus 2</i>	ACB13178.1	–
	<i>Solea senegalensis</i>	ADH51678.1	ADH51679.1
Salmoniformes	<i>Salmo salar</i>	CAD98923.1	CAE30288.1
	<i>Oncorhynchus rhodurus</i>	BAA86898.1	BAA84638.1
	<i>Onchorynchus mykiss</i>	AAQ04551.1	AAQ04550.1
Perciformes	<i>Oreochromis niloticus</i>	BAB16106.1	BAB16107.1
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AAV48628.1	AAV48629.1
	<i>Sparus aurata</i>	AAT01413.1	AAT01412.1
	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	ADE08459.1	ADE08460.1
	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	ABU49599.1	ABY56689.1
	<i>Rhabdosargus sarba</i>	ABI93201.1	ABI93202.1
	<i>Epinephelus coioides</i>	AEG65826.1	AEG65827.1
	<i>Scomber japonicus</i>	AGG36448.1	AGG36449.1
	<i>Epinephelus merra</i>	ADI60224.1	–
	<i>Oryzias latipes</i>	AB526237.1	AB526238.1
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	ACU28776.1	ACU28775.1
Scorpaeniformes	<i>Anoplopoma fimbria</i>	AGS55586.1	AGS55587.1
	<i>Sebastes schlegelii</i>	AEJ33654.1	ADV59773.2
Cyprinodontiformes	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	AER42420.1	–
	<i>Fundulus heteroclitus</i>	BAF48336.1	BAF48337.1
Gadiformes	<i>Gadus morhua</i>	ABD62885.1	ABD62886.1
Anguilliformes	<i>Anguilla japonica</i>	BAF79914.1	ACF35638.1
Primatas	<i>Homo sapiens</i>	AAH96831.1	NP_000224.2

3.6 Análises de expressão gênica - PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Devido à pequena quantidade de RNA total extraído por hipófise (até 1000 ng), optamos por sintetizar todos os cDNAs destinados às reações de qPCR neste estudo com 700 ng de RNA. As reações de qPCRs foram realizadas no equipamento Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), pertencente ao Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos do ICB – USP, coordenado pela Profa. Dra. Patrícia Gama. Para cada gene de interesse foram desenhados no mínimo três pares de

primers, a partir das sequências obtidas no processo de clonagem molecular. Estes primers foram desenhados segundo as recomendações do fabricante para o equipamento e todos foram submetidos a um rigoroso processo de validação. Para a quantificação dos produtos formados durante a reação de qPCR foi utilizado o reagente Power SYBR® Green Dye (Applied Biosystems).

Em primeiro lugar foi realizado o cálculo de eficiência de cada reação, utilizando-se de uma concentração de primer a 900 nm e uma curva de diluição seriada do cDNA de hipófise ou gônadas. Os primers utilizados deveriam ter um R^2 (replicabilidade da reação) próximo de 1, e uma eficiência entre 90 e 110%, dada pelo *slope* da curva, a qual é automaticamente calculada pelo *software* para cada reação, de acordo com a curva de diluição do cDNA utilizada. Valores de *slope* igual a -3.3 (curva gerada por cDNA diluído 10 vezes) ou igual a -2 (curva gerada por cDNA diluído 4 vezes) sugerem que os primers estão amplificando com aproximadamente 100% de eficiência, ao passo que valores mais negativos sugerem uma reação com menor eficiência. Em paralelo também foi realizada a análise da curva de dissociação (*melting*) para cada par de primers, com objetivo de verificar a homogeneidade dos produtos das reações (amplificação de um único produto em cada reação). Ao final do processo de validação, os primers que melhor se enquadraram nos critérios avaliados foram escolhidos (Tabela 5) e utilizados nas reações de qPCR do estudo.

Tabela 5 – Primers validados e utilizados nos ensaios de qPCR em *A. altiparanae*.

Primer	Sequência 5' → 3'	Amplicon (pb)	R ² (%)	Slope
<i>gpha F_4417</i>	TGCTGTGTTGCCAAGGAAATC	70	0,997	-2,32 ^a
<i>gpha R_4418</i>	GGCAGTCTGTGTGGTTCTGTAGTTT			
<i>fshb F3_4525</i>	GTCCTGATGATTCTGCTGCT	105	0,999	-3,39 ^b
<i>fshb R3_4526</i>	GCATTCTCGCTCTCCAC			
<i>lhb F_4419</i>	TGCCCAAATGCCTAGTGTTC	73	0,999	-2,21 ^a
<i>lhb R_4420</i>	TCTTGACACCGGATCCTTGGT			
<i>fshr F_4532</i>	TCAACGGTACCAAAATGGAAAAAC	71	0,998	-1,99 ^a
<i>fshr R_4533</i>	GGCATTGCTGTGGATATTCTTCA			
<i>lhr F_4517</i>	CCAGCCACTGCTGTGCTTTAC	75	0,999	-2,32 ^a
<i>lhr R_4518</i>	AAGATCCATTCTCAGTCCTGAAGAG			
<i>elfa1F_4501</i>	CACTGGTACCTCACAGGCTGACT	69	0,998	-2,05 ^a
<i>elfa1_4503</i>	CCAGCCTCAAACCTACCAACA			

^aSlope obtido com cDNA diluído quatro vezes.

^bSlope obtido com cDNA diluído dez vezes.

Reações de 20 µl [10 µl de *Power SYBR Green Universal Master Mix* (Applied Biosystems), 3 µl de cada primer (senso e antisenso) a 9 mM e 4 µl de cDNA diluído (1:25) para cada amostra foram analisados em duplicata, em placas de 96 poços e com as seguintes condições de ciclagem: uma etapa inicial de desnaturação e ativação a 50 °C por 2 min e 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e uma etapa combinada de anelamento e alongação de 60 °C por 1 min, seguida pela análise da curva de *melting* ao final de cada reação. Os níveis de transcrição dos genes alvo foram normalizados utilizando o gene endógeno *elfa1* e calculados pelo método $2^{-(\Delta Ct)}$, uma vez que os primers validados apresentavam eficiência maior que 90%.

3.7 Hibridização *in situ*

Hipófises de fêmeas adultas (n=5) foram coletadas e imediatamente fixadas em paraformaldeído 4% (PFA, Sigma) livre de RNase em PBS (pH 7,4) a 4 °C por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas e incluídas em paraplast. Cortes parassagitais foram obtidos e afixados em lâminas carregadas com cargas positivas Superfrost Plus Microscope slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA), secos a 37 °C por 24 horas e então submetidos à técnica de *hibridização in situ*, seguindo protocolo adaptado de Cerdá et al. (2008). Para a síntese das sondas, produtos de PCR para *gpha* (370 pb), *fshb* (411 pb) e *lhb* (400 pb) foram amplificados com o emprego de primers desenhados com os promotores T3 ou T7 (Tabela 6), os quais foram usados para a transcrição *in vitro* das sondas de cRNA senso e antisenso marcadas com digoxigenina (DIG), pela atividade das enzimas T3/T7 RNA polimerase em combinação com kit DIG RNA Labeling (Roche, 214 Mannheim, Germany).

Tabela 6 – Primers usados na síntese das sondas para hibridização *in situ*.

Primer	Sequência 5' → 3'
<i>gpha sense</i> ^a	T3Rpps-GTAAAACTACAGAACACACAGACTGCCACTG
<i>gpha anti</i> ^b	T7Rpps-GGGTTGCAACTGAGGCTTTATTTTGAAAATTATTAGAA
<i>fshb sense</i> ^a	T3Rpps-GGCAGCTGCATCACCATCGACACCA
<i>fshb anti</i> ^b	T7Rpps-GATAGATAGTTTATTAACCATTTCCCAATA A
<i>lhb sense</i> ^a	T3Rpps-GGCTGCCCAAAATGCCTAGTGTTTCAGA
<i>lhb anti</i> ^b	T7Rpps-GGAAAAAGCAAATGTTTTATTGTATTAAGAGTGTACTT

^aPrimers contendo a sequência promotora da T3 RNA polimerase na 3' (T3 Rpps)

^bPrimers contendo a sequência promotora da T7 RNA polimerase na 5' (T7 Rpps).

A reação de hibridização foi realizada usando 1 µg de cada sonda (senso ou antisenso) diluída no mix de pré-hibridização, em um câmara úmida, a qual foi encubada em uma estufa de hibridização a 65 °C por 18 horas. A seguir, os cortes foram incubados com o anticorpo anti-DIG conjugado com enzima fosfatase alcalina (AP, Roche, 1:1000), em câmara úmida a 4 °C por 18 horas. Após isso, os híbridos de RNA foram detectados pela atividade da enzima AP com a adição do substrato NBT/BCIP (Roche). Ao final, os cortes foram montados com *Aquamount* (Dako, Carpinteria, CA, USA) e lamínula, vedados com esmalte incolor e analisados por microscopia de luz.

3.8 Produção de anticorpos policlonais contra as subunidades beta das gonadotropinas

Todas as etapas de produção dos anticorpos foram realizadas pela empresa GenScript, Piscataway, NJ, USA. Uma vez que as subunidades beta das gonadotropinas apresentam certo grau de similaridade em suas sequências de aminoácidos, o primeiro passo foi alinhar as sequências deduzidas para o Fshb e Lhb de *A. altiparanae* para identificação de regiões sem homologias. A partir de então, as regiões identificadas de cada proteína foram analisadas por outros critérios adotados pela empresa, de modo a escolher a melhor sequência de peptídeo para a produção de cada anticorpo.

Um anticorpo contra a subunidade Fshb de *A. altiparanae* foi produzido em coelho, usando como epítipo um peptídeo sintético correspondente aos resíduos de aminoácidos 58-69 de sua sequência deduzida. À região C terminal deste peptídeo foi adicionada uma cisteína, a qual serviu para a conjugação da proteína carreadora *keyhole limpet hemocyanin*

(KLH). Já o anticorpo contra a subunidade Lhb foi produzido em rato, usando como epítopo um peptídeo sintético correspondente aos resíduos 64-75 desta subunidade, sendo também acrescido o resíduo de cisteína e a KLH como descrito. Ao final do processo de produção, o anti-Fshb foi purificado por coluna de afinidade, ao passo que o anti-Lhb foi purificado pelo método da proteína-G. A especificidade de ambos os anticorpos policlonais foi confirmada por imuno-histoquímica, como descrito a seguir.

3.9 Imuno-histoquímica e imunofluorescência dupla para a detecção de Fshb e Lhb na hipófise

Como inicialmente descrito, cabeças de fêmeas adultas de *A. altiparanae* (n=5) foram coletadas, e após a remoção da mandíbula e exposição do encéfalo, foram fixadas por imersão em solução de Bouin acético por 24 horas à temperatura ambiente. Então, as cabeças foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso do fixador, descalcificadas em RDO Gold (Apex, Aurora, IL, USA), desidratadas em soluções alcoólicas crescentes, diafanizadas em xilol e incluídas em Paraplast (Sigma). Cortes parassagitais seriados foram obtidos e fixados em lâminas tratadas com Poli-L-Lisina (Sigma).

Para a imuno-histoquímica, os cortes foram reidratados em concentrações alcoólicas decrescentes e por último em PBS. A atividade da enzima peroxidase endógena foi inativada pela incubação dos cortes em solução de Peróxido de Hidrogênio 3% em PBS. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado em uma solução de soro de cabra 5%, em soro de albumina bovina (BSA) 0,1%, em PBS Tween 0,1% (PBST). A seguir foi feita a incubação com os anticorpos primários, anti- *A. altiparanae* Fshb (1:1500) feito em coelho e anti- *A. altiparanae* Lhb (1:20) feito em rato, em câmara úmida por 18 horas a 4 °C. A seguir, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário Super Picture Polymer (Invitrogen) conjugado com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP), por 10 min à temperatura ambiente. Após duas lavagens em PBS, a reação foi revelada com o uso do substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Invitrogen). Os cortes foram contracolorados em

Hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com Goma de Dámar e lamínula, para posterior análise por microscopia de luz.

Para a imunofluorescência dupla, após a reidratação, os cortes foram imersos em uma solução de Glicina 1% em PBS por 30 min à temperatura ambiente, para a redução da fluorescência endógena e, então, bloqueada como já descrito. A seguir, foram incubados com os seguintes anticorpos secundários fluorescentes: anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 (fluorescência verde, Fshb) e anti-IgG de rato conjugado com Alexa 594 (fluorescência vermelha, Lhb), ambos da Invitrogen. Estes foram diluídos 1:100 em PBS e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram lavados em PBS e montados com o meio de montagem Prolong Gold (Invitrogen) e lamínula, vedados com esmalte incolor e armazenados a -20 °C até a análise por microscopia de fluorescência.

A especificidade dos anticorpos anti-Fshb e Lhb de *A. altiparanae* foi avaliada pela substituição de cada anticorpo primário pelas seguintes soluções: (a) anticorpo préadsorvido com seu respectivo peptídeo (solução 1:5), (b) com seus respectivos soros pré-ímmes e (c) por PBS. Todas as reações controle não resultaram em imunomarcacão.

3.10 Imuno-histoquímica e imunofluorescência dupla para a detecção de Fshr e Lhr nas gônadas

Os anticorpos utilizados na imunolocalização dos receptores de gonadotropinas nas gônadas de *A. altiparanae* foram gentilmente doados pelo Dr. Joan Cerdà, do IRTA-Institut de Ciències del Mar, Barcelona, Espanha. Os anticorpos policlonais anti-Fshr e anti-Lhr foram produzidos em coelhos, a partir de peptídeos sintéticos correspondentes aos resíduos de aminoácidos 657 – 671 e 641 – 657 das sequências para Fshr (ADH51678) e Lhr (ADH51679) de *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes). Para maiores detalhes sobre a caracterização destes anticorpos, ver Chauvigné et al. (2012). Da mesma forma, realizamos um alinhamento entre as sequências de Fshr e Lhr de *S. senegalensis* com aquelas obtidas para *A. altiparanae* na primeira etapa deste estudo. Como observado na Figura 8, verificamos que as respectivas sequências homólogas entre ambas as espécies também

apresentaram alta similaridade de aminoácidos em sua região C-terminal, podendo reconhecer as respectivas proteínas em *A. altiparanae*.

<i>Astyanax altiparaane</i> Fshr	FKTRAHMYRTET SSG
<i>Solea senegalensis</i> Fshr	FKTRAQ I YRTESMSC
66% de homologia	
<i>Astyanax altiparaane</i> Lhr	TKAFRKDACMMMST IGC
<i>Solea senegalensis</i> Lhr	TKAFRKDALQ L L N TAGC
65% de homologia	

Figura 8 – Alinhamento da região C-terminal das sequências obtidas para Fshr e Lhr de *A. altiparanae* (Characiformes) e *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes). Os aminoácidos marcados em cinza são conservados entre as espécies. Em negrito está apresentada a identidade de aminoácidos das sequências homólogas entre ambas as espécies.

Para este fim, fragmentos de testículos e ovários (n=5) de espécimes adultos foram coletados, fixados Bouin Acético (por 24 horas à temperatura ambiente), lavados em água corrente e processados histologicamente, como já detalhado na sessão anterior. A seguir, procedeu-se à imunolocalização individual de Fshr e Lhr nos testículos e ovários por imunoperoxidase, bem como à dupla marcação de ambas as proteínas nos testículos por imunofluorescência.

Na imuno-histoquímica por peroxidase, os cortes foram reidratados, lavados em PBS e permeabilizados em Triton X-100 0,2% em PBS, à temperatura ambiente por 10 min. A seguir, os cortes foram lavados duas vezes em PBS por 10 min, submetidos à inativação da peroxidase endógena (com peróxido de hidrogênio 3% em PBS, por 30 min) e ao bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos (solução de soro de cabra 5%, em BSA 0,1%, em PBST 0,1%, por 45 min à temperatura ambiente). Então, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-*S. senegalensis* Fshr ou Lhr, ambos diluídos a 1:200 em solução de soro de cabra 1%, em BSA 0,1%, em PBST 0,1%, por 18 horas a 4 °C. Ao final, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário, revelação com DAB e montagem das lâminas, como detalhado na sessão anterior.

Para a imunofluorescência dupla, após a reidratação e permeabilização dos cortes, os mesmos foram imersos em uma solução de glicina 1% em PBS, por 30 min à temperatura ambiente, para redução da fluorescência endógena. A seguir, os cortes foram bloqueados e procedeu-se à incubação com o primeiro anticorpo primário, anti-*S. senegalensis* Fshr, na mesma diluição e condições de incubação acima descrita. A seguir, os cortes foram lavados em PBS (três vezes por 10 min) e incubados com anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 (diluído 1:100 em PBS), por uma hora à temperatura ambiente e, ao final, lavados em PBS (três vezes por 10 min), sendo então destinados à incubação com o segundo anticorpo primário.

Uma vez que ambos os anticorpos primários foram desenvolvidos em coelho, para evitar reações cruzadas dos anticorpos secundários (anti-IgG de coelho) com ambos os anticorpos primários, antes do início da segunda marcação os cortes foram incubados em uma solução de PFA 4%, por 15 min à temperatura ambiente, visando a destruição dos epítomos das moléculas de IgG remanescentes da primeira imunomarcação, seguindo o protocolo de Chauvigné et al. (2012).

Após esta etapa, os cortes foram lavados em PBS (duas vezes por 5 min) e incubados com o segundo anticorpo secundário, anti-*S. senegalensis* Lhr, na mesma diluição e condições de incubação já descritas. A seguir, os cortes foram incubados com o segundo anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 594 (diluído 1:100 em PBS), por uma hora à temperatura ambiente. Ao final, os cortes foram lavados em PBS e montados com o meio de montagem Prolong Gold e lamínula, vedados com esmalte incolor e armazenados a -20 °C até a análise por microscopia de fluorescência.

A especificidade destas imunomarcações foi realizada pela substituição dos anticorpos primários por PBS, resultando na não detecção de marcações. Também foram realizadas algumas tentativas para caracterizar estes anticorpos por Western Blott em lisados de testículo e ovários de *A. altiparanae*. Entretanto, não foi possível incluir estes resultados neste estudo, uma vez que a detecção de receptores de membrana por Western Blotting requer uma extensiva padronização. Como os resultados das imunomarcações nos

cortes das gônadas de *A. altiparanae* apresentaram o mesmo padrão das marcações reportadas em estudos prévios com estes anticorpos (CHAUVIGNÉ et al., 2012; 2014), concluímos que os mesmos poderiam ser utilizados com sucesso na imunolocalização do Fshr e Lhr de *A. altiparanae*.

3.11 Dosagens de esteroides sexuais

Os níveis plasmáticos de 17 β -estradiol (E₂) e 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α , 20 β -DHP) nas fêmeas, e de testosterona (T) e 11-ketotestosterona (11KT) nos machos, foram quantificados pela técnica de ELISA com o emprego de kits comerciais da Cayman (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). Estes kits foram previamente validados em duas espécies de Characiformes, *Hoplias malabaricus* (GOMES et al., 2015) e *Salminus hilarii* (MOREIRA et al., 2015). Todas as amostras de plasma foram analisadas em duplicatas e seguindo as instruções específicas de cada kit. Ao final de cada ensaio, a absorbância das amostras foi mensurada a 405 nm com um leitor de microplaca (Spectra Max 250 Molecular Devices) e os resultados expressos em pg ml⁻¹. Os limites de detecção para E₂ e 17 α , 20 β -DHP foram de 19 e 15 pg ml⁻¹, respectivamente. Para a T e 11-KT, os limites de detecção foram de 6 e 1,3 pg ml⁻¹.

3.12 Histologia gonadal

Após a coleta e fixação dos fragmentos dos testículos e ovários, os mesmos foram processados para inclusão em glicol metacrilato (Leica Historesin Embedding Kitt, Wetzlar, Germany) segundo as instruções do fabricante. Cortes de 3 μ m foram obtidos e fixados em lâminas de vidro previamente limpas com álcool 70%. A seguir, os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina & Eosina, desidratados e montados com meio de montagem e lamínula. A análise dos cortes histológicos foi realizada com o uso do Microscópio Zeiss Axioscop 2 e as fotomicrografias foram obtidas com câmera digital MRc5 e o software Zen (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). A identificação das células

germinativas, bem como das fases reprodutivas, foi feita de acordo com a nomenclatura proposta por Brown-Peterson et al. (2011).

3.13 Análise estatística

Os resultados do qPCR, ELISA, IGS e IHS obtidos bimensalmente foram comparados e expressos pela média $\pm$ erro padrão da média (EPM), sendo submetidos ao *one way*-ANOVA, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey, ao nível de significância $p < 0,05$. Estas análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 4 (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem de fragmentos parciais para os genes *gpha*, *fshb*, *lhb*, *fshr*, *lhr* e *elfa1*.

Com o uso dos primers degenerados, foram inicialmente amplificadas por RT-PCR produtos parciais únicos para os genes *gpha*, *fshb* e *lhb*, com 240, 212 e 260 pares de bases (pb), respectivamente. Ainda, também foram isolados outros produtos para os genes *fshr*, *lhr* e *elfa* com 473, 715 e 424 pb, respectivamente. Após a análise destas sequências pela ferramenta BLAST, foi constatado que as mesmas eram homólogas aos genes de interesse neste estudo, uma vez que apresentaram alta identidade com as sequências de outras espécies de peixes.

4.2 Caracterização molecular das subunidades *gpha*, *fshb* e *lhb*

As reações de RACE PCR permitiram a obtenção dos cDNAs completos das subunidades *gpha*, *fshb* e *lhb* de *A. altiparanae* (Figura 9).

O cDNA completo para a subunidade *gpha* cDNA (Figura 9A) é formado por 744 nucleotídeos, consistindo de uma 5'-*untranslated region* (5' UTR) de 40 nucleotídeos, uma região codificante (ORF) de 357 nucleotídeos (nucleotídeos 41 a 397), seguida por uma 3' - *untranslated region* (3'-UTR) de 347 nucleotídeos. Um sinal de poliadenilação (AATAAA) foi reconhecido 21 nucleotídeos anteriores à cauda poli (A) de 37 pares de bases (nucleotídeos 708 a 744). A tradução desta ORF resultou em um peptídeo de 118 aminoácidos, composto por um peptídeo sinal predito de 24 aminoácidos e pelo peptídeo Gpha de 94 aminoácidos, que apresentou um peso molecular calculado de 10,78 kDa. O peptídeo para Gpha apresentou 2 sítios putativos de N-glicosilação nas posições 79-81(Asn-Ile-Thr) e 104-106 (Asn-His-Thr), levando em consideração a numeração dos aminoácidos do peptídeo sinal.

(A) *gpha*

1 AGTTGAAGACACTCCTGGGGTGAAGAACAGCAGAGCTAGAAATGATTCTGATCATTAAATACACCGGAGCAGCCGTCCTTT 80
M I L I I K Y T G A A V L 13

81 TGCTGTCAGTTCTAATTCAGATCGGACAGCTTTATCCACACAACGACATGTACTTTGGCTGTGAGGATTGCAAACCTGAGG 160
L L S V L I Q I G Q L Y P H N D M Y F G C E D C K L R 40

161 GAGAACAGCATCTTCTCCAGACCTGGCGCCACTGTGTATCAGTGCATGGGATGCTGCTTTCCAGGGCTTATCCGACTCC 240
E N S I F S R P G A T V Y Q C M G C C F S R A Y P T P 67

241 ACTCCGCTCCAAAAAGACAATGCTGGTCCCAAGAACATCAGATCGGAGGCCACATGCTGTGTGCCAAGGAAATCCAAA 320
L R S K K T M L V P K N I T S E A T C C V A K E I Q 93

321 GGGTTTTTGTCAACAATGTAAACTACAGAACCCACACAGACTGCCACTGCAGCACTTGCTATCACCATAAATCCATAATA 400
R V F V N N V K L Q N H T D C H C S T C Y H H K S 118

401 TCAAGCCTTCAAATCCTCACTTACCTCCAGACAAGGATACTGATGCTTGCTTGCTACTGCTGTGAAGATGTCACCTTGAC 480
481 TTTAAAGAGTTTACTGCTGACAGTGTGCAAGCTTTGTATTGTGAGCTTTATAAGGTTTTCATATGTTAAGAATGTAAA 560
561 ATGGTTACACTCATCTTTAATATATCTAGAACAGGTCTGTAGTTAGCAAAGCCTGCTAAATATGGTACTTTCCAGT 640
641 GCAATCTCAATTCTAATATTTCAATTTAATTCTAATAATTTTCATAATAAAGCCTCAGTTGCAACCC poly(A)₃₇ 744

(B) *fshb*

1 AATAAGACGGTAGGAATCTCCAACAGGTGAGGATGAGTGTAGTGGTCTGATGATTCTGCTGCTGCCTGCTCTGCTGAGG 80
M S V V V L M I L L L P A L L R 16

81 GGAGCACCAGGATGTAAGGCCAGCTGCCGCCTTACCAACATCTCCATCACTGTGGAGAGCGAGGAATGCCGCAGCTGCAT 160
G A P G C K A S C R L T N I S I T V E S E E C G S C I 43

161 CACCATCGACACCACGGCCTGCGCCGGCTTCTGCCACACGCAGGAAATAATTACAACAATCCGGTGGTGCCTAATGTTC 240
T I D T T A C A G F C H T Q E N N Y N N P V V P N V 69

241 AGAACATCTGCAACTTCAAGGAGTGGACATACGAGACTGTCCAGCTGACGGGCTGCCCGCGGGGTGGACTCGTCCTTC 320
Q N I C N F R E W T Y E T V Q L T G C P A G V D S S F 96

321 ACTTACCCCTGGCCCTGAGCTGCGAGTGCAGCCAGTGCAAAACGGACAGCAGCACTGCGCAGCTCTCAGCATGCAGCC 400
T Y P V A L S C E C S Q C K T D S T D C A A L S M Q P 123

401 CAGCAGCTGCCACATGTTCTCCCACTACGACACGACCCACACTGCCTCAGCTCTGCTACCATCACTGCTCATAACCTTAC 480
S S C H M F S H Y 132

481 CCAGAGATCTGGATGTATGAT 560
561 AACT poly(A)₄₅ 609

(C) *lhb*

1 ACTTCAAGGAAAGTACAAGAGCCTGCTGAGCATCACAGAAACATTTTCAAAGATGGTCTTTTCCATTTTGTACCTTCC 80
M A A F P F C T F 9

81 TTATCTATTGCACTTTGGCAGCTTACTCATCATCCCTGCTCAGAGCTATCTTCTACAGCCCTGTGAGCCTGTCAATGAG 160
L I L L H F G T L L I I P A Q S Y L L Q P C E P V N E 36

161 ACTGTGTCTGTGAGAAGGAAGGCTGCCAAAATGCCTAGTGTTCAGACCACTATTTCAGTGGACATTGCCTCACCAA 240
T V S V E K E G C P K C L V F Q T T I C S G H C L T K 63

241 GGATCCGGTGTACAAGAGCCCATCTCCACCATCTATCAGCATGTGTGCACCTATAGGGATGTTGCTATGAATGTTC 320
D P V Y K S P F S T I Y Q H V C T Y R D V R Y E I V 89

321 GCCTGCCTGACTGTCCCTCTGGTGTGACCTTATGTGCATATCTCTAGCTCTCAGTTGTGACTGTAGCCTGTGCACC 400
R L P D C P P G V D P Y V T Y P V A L S C D C S L C T 116

401 ATGGACACCTCTGACTGTACCATGAAAGCCTAAAGCCAGATTTCTGCATGGCGAAGAGAGAGTTCATTGTTGACTACTA 480
M D T S D C T I E S L K P D F C M A K R E F I V D Y 142

481 AACATCAACAGCATGTGTTTCAATTTGGAAGCATCTGTATCTGTACTACAGAAATATACAGTAAAAAGTACACTCTTAATA 560
561 CAATAAAACATTTTGTCTTTTCC poly(A)₅₄ 638

Figura 9 – Sequência nucleotídica e de aminoácidos deduzida do cDNA completo para *gpha* (A), *fshb* (B) e *lhb* (C) de *A. altiparanae*. Os códons inicializador e finalizador estão marcados em cinza. Os peptídeos sinais estão sublinhados. Os resíduos de cisteínas estão circulados. Os sítios de poliadenilação estão marcados em preto e os sítios de N-glicosilação estão marcados com um retângulo. O número subscrito indica a extensão da cauda poli A.

O cDNA para *fshb* (Figura 9B) apresenta 609 nucleotídeos com uma ORF de 399 nucleotídeos. O códon inicializador está localizado no nucleotídeo 33 e o código finalizador no nucleotídeo 431. Consequentemente, sua ORF é precedida por uma 5'UTR de 32 nucleotídeos e seguida por uma 3'UTR de 133 nucleotídeos (nucleotídeos 432 a 564). A 3'UTR do *fshb* apresenta um sinal de poliadenilação (AATAAA, nucleotídeos 545-550) localizado a 20 nucleotídeos anteriores à cauda poli A de 45 nucleotídeos de extensão. A sequência de aminoácidos deduzida originou um peptídeo com 132 aminoácidos, iniciada com um peptídeo sinal predito de 17 aminoácidos e seguido pelo peptídeo Fshb de 115 aminoácidos, o qual apresentou um peso molecular de 12,44 kDa. O Fshb de *A. altiparanae* contém um único putativo sinal de N-glicosilação na posição 29-31 (Asn-Ile-Ser).

O cDNA completo para o *lhb* (Figura 9C) consiste de 638 nucleotídeos, com uma ORF de 429 nucleotídeos que se inicia no nucleotídeo 53 (no primeiro nucleotídeos do códon iniciador ATG) até o nucleotídeos 481 (último nucleotídeo do códon finalizador). A ORF deste cDNA é precedida por 52 nucleotídeos da 5'UTR e seguida por 103 nucleotídeos da 3'UTR. Um típico sítio de poliadenilação (AATAAA; nucleotídeos 562-567) está localizado a 23 nucleotídeos acima da cauda poli A (nucleotídeos 585 a 638). A sequência deduzida para o Lhb origina um peptídeo com 142 aminoácidos, com um peptídeo sinal predito de 25 aminoácidos e um peptídeo Lhb maduro de 117 aminoácidos. Este, por sua vez, apresenta um peso molecular estimado de 13,26 kDa. O Lhb maduro também apresenta um único sítio de N glicosilação, na posição 35-37 (Asn-Glu-Thr), bem como um único sítio de O-glicosilação predito na posição 126 (Ser).

O alinhamento da sequência de aminoácidos da Gpha de *A. altiparanae* com outras espécies de peixes e humano revelou a presença de 10 resíduos de cisteínas altamente conservados (Figura 10A). Já a subunidade Fshb apresenta um total de 13 cisteínas (Figura 10B), sendo o décimo terceiro resíduo localizado na região N-terminal (marcado como 3'Cys na Fig. 9B) antes do primeiro resíduo de cisteína conservado encontrado na sequência para Fshb em tetrápodos. Já o Lhb exibe 12 resíduos de cisteínas altamente conservados (Figura 10C).

As análises *in silico* revelaram que as subunidades Fshb e Lhb apresentam 31% de identidade aminoácídica, enquanto a subunidade Gpha compartilha 8 e 10% de identidade com as subunidades Fshb e Lhb, respectivamente.

A subunidade Gpha apresenta a maior similaridade (92%) com a sequência anotada por meio de predição gênica em *Astyanax mexicanus* (espécie do mesmo gênero) e *Clarias gariepinus* (82%) e outras espécies de Siluriformes (80–82%), seguida por Cypriniformes (55–75%), Osteoglossiformes (92%), Anguiliformes (63%) e Salmoniformes (58–67%).

Da mesma forma, a sequência para o Fshb apresenta a maior homologia para a sequência predita para *A. mexicanus* (92%), seguida de *C. gariepinus*, *Ictalurus punctatus* (68%) e outras espécies de Siluriformes (65–68%), Cypriniformes (52–63%), Anguiliformes (51%) e Salmoniformes (40%). A subunidade Lhb também apresenta a maior similaridade com *A. mexicanus* (96%), seguida por *Silurus meridionalis* (77%) e outras espécies de Siluriformes (74–77%), e também apresenta 66–76%, 64–65% e 63% de identidade com as sequências das ordens Cypriniformes, Anguiliformes e Salmoniformes, respectivamente.

As análises filogenéticas para as três subunidades das gonadotropinas de *A. altiparanae* mostraram que elas formam um grupo monofilético com aquelas das ordens Siluriformes (Figura 11). No geral, as três árvores apresentam topologias similares, evidenciando que as três subunidades são próximas a subunidades de espécies das ordens Siluriformes, Cypriniformes, Osteoglossiformes, Anguiliformes e Salmoniformes, nesta ordem, corroborando os dados da identidade de aminoácidos.

(A) Gpha **(B) Fshb** **(C) Lhb**

Figura 11 – Relações filogenéticas das subunidades Gpha (A), Fshb (B) e Lhb (C) de *A. altiparanae* com outras espécies. As árvores foram reconstruídas usando o algoritmo Neighbor-Joining algorithm (1.000 replicatas). Os números indicam os *bootstraps* e somente os nós com mais de 50% de *bootstraps* foram indicados. A sequência do hormônio glicoproteico alfa 2 (ACI87878) de *Petromyzon marinus* foi usada como grupo externo na análise da Gpha, ao passo que a sequência da gonadotropina do tipo beta (AW56433) desta mesma espécie foi usada nas análises para Fshb e Lhb. A escala corresponde a 20% de diferença entre as sequências.

4.3 Expressão de mRNAs das subunidades das gonadotropinas em diferentes órgãos

A possível expressão de *gpha*, *fshb* e *lhb* foi avaliada por qPCR em diferentes órgãos de *A. altiparanae*. Como visto na Figura 12, a expressão destes três transcritos foi detectada apenas na hipófise.

Figura 12 – Expressão relativa dos mRNAs para *gpha*, *fshb* e *lhb* em diferentes órgãos (n=3) de machos e fêmeas adultas de *A. altiparanae*. Não detectável (ND). Os dados (média $\pm$ o erro padrão da média) foram normalizados em relação aos valores encontrados na hipófise.

4.4 Localização dos mRNAs e proteínas das subunidades das gonadotropinas na hipófise

A expressão celular dos mRNAs para as subunidades das gonadotropinas na hipófise de *A. altiparanae* foi investigada pela técnica de hibridização *in situ* (Figura 13A-D). Um forte sinal para *gpha* foi observado por toda a proximal pars distalis (PPD), Figura 13A, indicando que os mRNAs desta subunidade também é expresso pelas células que expressam Fsh, Lh e Tsh. Como esperado, o sinal para *fshb* também foi observado na PPD, porém distribuídos em pequenos grupos (Figura 13B). Em contraste, o sinal para *lhb*

apresentou ampla distribuição e ocupava a maior parte da PPD (Figura 13C), indicando uma população maior de células gonadotrópicas que expressam *lhb*. Nenhum sinal foi observado quando as sondas senso foram utilizadas (Figura 13D), corroborando a hibridização específica das sondas anti-senso.

Figura 13 – Detecção dos mRNAs para *gpha*, *fshb* e *lhb* por hibridização *in situ* (A – D) e caracterização das proteínas Fshb e Lhb na hipófise de *A. altiparanae* com o uso de anticorpos policlonais específicos (E – L). (A) sonda anti-senso para *gpha*, (B) sonda anti-senso para *fshb*. (C) sonda anti-senso para *lhb* e (D) sonda senso para *gpha*. Hibridizações com as sondas senso para *fshb* e *lhb* apresentaram resultados similares (dados não mostrados). (E) Imunomarcação com anti- *A. altiparanae* Fshb e (F) ampliação da região pontilhada em E. (I) Imunomarcação com anti- *A. altiparanae* Lhb e (J) ampliação da região pontilhada em I. Reações controle utilizando os anticorpos Fshb (G) e Lhb (K) pré-adsorvidos com seus respectivos peptídeos. Reações controle utilizando soro normal de coelho (H) e soro normal de rato (L) em substituição aos anticorpos primários. Note que

os cortes A–D, G e K não apresentam a pars intermedia (PI). Rostral pars distalis (RPD), proximal pars distalis (PPD). Escala: 200 μm (A–E, G–I, K, L), 20 μm (F, J).

Uma vez que a técnica de hibridização *in situ* não permitiu discernir quais tipos celulares expressavam tais mRNAs, nós também analisamos a expressão das proteínas Fshb e Lhb por imuno-histoquímica. Os anticorpos desenvolvidos contra os peptídeos sintéticos das subunidades Fshb e Lhb de *A. altiparanae* resultaram em imunomarcações específicas para população de células gonadotrópicas (Figura 13E, F, I, J). Todos os controles realizados durante a caracterização destes anticorpos (ver Material e Métodos) não apresentaram qualquer tipo de marcação (Figura 13G, H, K, L).

Confirmando os dados inicialmente obtidos pela hibridização *in situ*, foi observado que ambas as populações de células gonadotrópicas (que expressam Fshb/Lhb) estão distribuídas pela PPD (Figura 12 E, I). As células que expressam Fshb eram, em geral, arredondadas ou poligonais, e às vezes fuziformes e estavam distribuídas em pequenos grupos ou também ao redor dos ramos da neuro-hipófise (Figura 13E, F). As células que expressam Lhb eram globosas, mais abundantes que as células produtoras de Fshb, e apresentavam-se distribuídas de forma aleatória pela PPD (Figura 13 I, J). O emprego da técnica de imunofluorescência dupla com estes anticorpos revelou que as proteínas Fshb e Lhb são expressas por distintas populações de células gonadotrópicas (Figura 14), ou seja, na hipófise de *A. altiparanae* existem duas populações de células gonadotrópicas, as que expressam Fshb e as que expressam Lhb.

Figura 14 – Análise da dualidade das células gonadotrópicas em *A. altiparanae* por imunofluorescência dupla com o uso de anticorpos policlonais específicos. (A, D) Imunomarcagem com anti- *A. altiparanae* Fshb marcado com Alexa 488 (fluorescência verde). (B, E) Imunomarcagem com anti- *A. altiparanae* Lhb marcado com Alexa 594 (fluorescência vermelha). (D, E) Ampliação de regiões da proximal pars distalis (PPD) vistas em A e B. Note que as marcações para Fshb ou Lhb estão presentes em células gonadotrópicas distintas e que estes sinais não se colocizam. A fluorescência de cada marcação e as imagens sobrepostas (C, F) mostram que estas são derivadas dos mesmos cortes. Rostral pars distalis (RPD) e pars intermedia (PI). Escala: 100 μ m (A–C), 10 μ m (D–F).

4.5 Caracterização molecular dos receptores de gonadotropinas

Com a obtenção de sequências parciais de cDNA homólogas aos genes dos receptores dos hormônios folículo-estimulante e luteinizante, foi realizada a técnica de RACE PCR, permitindo a obtenção dos cDNAs completos para ambos os genes.

O cDNA completo para *fshr* tem 2594 nucleotídeos, sendo composto por uma região 5' (UTR) de 380 nucleotídeos, uma região codificante (ORF) de 2010 nucleotídeos e uma região 3' UTR de 183 nucleotídeos, incluindo a cauda poli A (Figura 15).

***fshr* e Fshr**

```

GAAAATGGCTTTGGCTGGAGAGATCCTGACCAATCGCACTGCCGCTCAGCCAGAACTCACCACCATTGAGCGTTCATCCAAAAGACATCCTGCGAAGCCAC 102
ACACGAGCAGCCCCCTGCCTCATAGAAGCGATCAGCGGACATCCAGAGCCTGGTGACGATGGAGGCCCTGCTGTGGTGCACTGCACCTGAGGAAGCTCACCAAA 202
GTGCTTTAGAACTTTTGTGATTTATATCCAGAGGTTAAACAGGTCAATATAGAGATCATACCAACCAAGACTGCGGAGAAAGAACTCTCTGAACTTTC 302
AGGAACTTCCATGAACCTTCTAGGAACCTCCAGGAACCTCTAGGAACCTTCCAGACCTTTCCACCTGAGACAGCAGAGAGATGAACATGATGATGATGA 402
M N M M M M M

TCTGGATGATGCTGCTGAGCCCCAGCCTCAGCTGGCTCCTGGCTCATACACACAGCACACCTGGTCTCCACACCTGCTCAGCCAATGGCACGACTCG 502
I W M M L L S P S L S W L L A H T H S T H L V S H T C S A N G T T R
CTCGTTCTTCTGCTGGGTAGTAAATCCATCAATTGCCAAGCGCCATACCCAAAAATACCACATACGTGGAGATCAAGCTGACTCAGATCAGTGTGTTT 602
S F F C L G S K V H Q L P S A I P K N T T Y V E I K L T Q I T V F
CCACAAGGAGCCATCTTATCTCTTCATGAGCTCAAACGCATAATGGTGTCTGAGAACGGAGCCCTCAAGCAAAATCGGAGCCCGCATTGCGTAACCTCA 702
P Q G A I L S L H E L K R I M V S E N G A L K Q I G A H A F A N L
CCAACTAGAGGAGATACTATACTAAATCCAAAAACCTCATCACCATACACAAAGACGCCCTTCTGGGGACTCCCGAAATGAAATATTTGACCATTTC 802
T K L E E I T I T K S K N L I T I H K D A F W G L P K L K Y L T I S
AAACACTGGTCTCACAATTTCTGCCGAGCTTCTCCAAGGTCAGTCTGCTGCACTCGAGTTTCTGTTGACCTACAGGACAACATGCACATAGAGGTGATA 902
N T G L T I L P D F S K V Q S A A L E F L F D L Q D N M H I E V I
CCAGCAATGCTTTCCATGGACTTACAGTGGTATCATATCTGAACCTCCGACTGTCCAAGAACGGGATCACCAGTGGATGTTAATGCCTTCAACGGTA 1002
P S N A A F H G L T S G L I S E E L R L S K N G I T K V D V N A F N G
CCAAAATGGAAAACTGTTTCTCATGGGAAACCAACACTGAAGAATATCCACAGCAATGCCCTTTCTAGGAGCTGAAGGCCCGCTGCTTCTGGAGCTTC 1102
T K M E K L F L M G N Q Q L K N I H S N A F L G A E G E V V L D V S
TCGCACTGCCATCAGTTCCTTACCTGAGAGCATGCTGAGGAGTCTGAAGCTGCTGACTGCCACCTCTGTCTACTCTCTGAGATGGTTACCCAGCTGGAG 1202
R T A I S L P E S M L R S L K L L T A T S V Y S L R W L P S L E
CTGTTTGTGAGCTCACCAGGCCAACCTCACCTACCCAGCCACTGCTGCGCCTTCAAAAACCTCAAAAAGAACAAAGTCAGAGAAACAATTTGTGTA 1302
L F A E L T Q A N L T Y P S H C C A F K N F K K N K S E K N N L C
ACGACCCCGCCCTCCGCAACCGAGGAGCCAGGCTTTTTCGAGGAGCACTGTAAAGGAGCTGATCAAAGTGACCTGTTCCCGAAGCCGGATGCTTTCAACC 1402
N D P A I L R N Q E P G F F E E H C K D V I K V T C F P E P D A F N P
ATGCGAGGACATCATGGGCTTCACCTTCTGAGGGTCTTATCTGTTTCACTGATATCCTAGCCATCGTGGGAACTCCACTGCTCCTGCTGCTCCTC 1502
C E D I M G F T F L R V L I W F I S I L A I V G N S T V L L V L L
AGCAGCGTTACAAAGCTGACTGTGCCAGGTTCTCATGTGCCACCTGGCCTTCGCTGACCTCTGCATGGGGCTCTACCTGCTGATGATGCTGCGCGTGG 1602
S S R Y K L T V P R F L M C H L A F A D L C M G L Y L L M I A A V
ACATCCAAACCCGCTCCCACTACTACAACCATGGCATGCACTGGCAGACCGGCCAGGGTGGCGGGGGCGGCTTCTTACGGTCTTTCGCGAGCGAGCT 1702
D I Q T R S H Y Y N H G I D W Q T G P G C R A A G F F T V F A S E L
GTCTGTCTACACTTTGACGGCCATCAGCTGGAGCGCTGGCACACCATCACTCAGCCATGCACTGGAGAGGAGAGCTGCGCCTGCGCCATGCATCGCA 1802
S V Y T L T A I T L E R W H T I T H A M Q L E R Q L R L R H A C A
CTAATGGCGGGTGGATGGATCTTTGCTGTACTGACTGCACTGCTGCCATGTTGGGCGTGAGCAGCTTCATGAAGACCGAGCATCTGCATACCCATGGAGC 1902
L M A G G W I F A V L T A L L P M L G V S S F M K T S I C I P M D
TGGAGACCGCACTGTGCCAAGGCTACGTGATCTGCTCCTGCTGCTCAAGTAGCAGCGTTCCTTTGCGTCTGCGTATGCTACCTTCGCATCTACATGAC 2002
V E T A L S Q G Y V I L L L L L N V A A F L C V C V C Y L R I Y M T
TGTGCGCAACCCCTGACTTCTGTGCACGCCATGCGGACATGCGGGTGGCCAAAGCGCATGGCAGTCTCATCTTCAACGACTTCCTCTGCATGGCAGCCATC 2102
V R N P D F V H A H A D M R V A K R M A V L I E T D F L C M A P I
TCCTTTTGGCATCTCCGCTGCACTCAAGCTGCCACTCATAACGGTGTGCGATGCCAAGGTGCTGCTGGTGTCTTCTACCCAACTCAACTCATGCGCCA 2202
S F F A I S A A L K L P L I T V S H A K V L L V L E Y P I N S C A
ACCCCTCTCTCTAGGCTTCTTCAACAGACCTTCAAGAGGGACTTCTTCACTGCTGGCAGTCTGTTTCGGCTGCTTCAAGACAAGGGCGCACATGATCG 2302
N P F L Y A F E T K T F K R D F F M L A S R F G C F K T R A H M Y R
CACCAGACCTCTCTGGGAGAACGGGGCTGGCAGACCTCTCCGAAGACCGCATGGGACTCTTACTACTGCTGCACCTCAGTCACCCCTCACTTA 2402
T E T S S G Q N G A W Q T S P K T S D G T L Y S L V H L S H P H L
ACCCACTGAACCTCCACTGACCCCATGGACCTTACTGACCCCAATGACCTCACCATCCCCAGAGCTTTCCAGAGCTTTGAACTGCAAGCTGCTCTTATGT 2502
T H
CTTATGTTCTCTACATACAAATACAATAGTTAATTCTCTGNTGCTTGGACTCATAAATACAAATAG poly (A) 26 2594

```

Figura 15 – Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas do *fshr* de *A. altiparanae*. Os códons iniciador e finalizador estão marcados em cinza. O peptídeo sinal predito está em negrito. Os resíduos de cisteínas estão circulados. Os sítios de poliadenilação estão marcados em cinza escuro. Os sítios de N-glicosilação estão marcados em preto. Nove repetições imperfeitas ricas em leucina estão marcadas por retângulos e os sete domínios transmembrana estão sublinhados. A numeração subscrita indica a extensão da cauda poli A.

Dois sítios de poliadenilação foram localizados a 41 nucleotídeos (AATACA) e a 9 nucleotídeos (CATAAA) anteriores à cauda poli A. A tradução da região codificadora do *fshr* resultou em uma proteína de 650 aminoácidos (Figura 15), precedido por um peptídeo sinal de 17 aminoácidos, apresentando um peso molecular de 73,7 kDa. A sequência madura do Fshr de *A. altiparanae* apresenta 19 resíduos de cisteína, sendo 13 altamente conservados entre as espécies de vertebrados comparadas, e sete possíveis sítios de N-glicosilação (Asn^{37, 60, 106, 206, 283, 299 e 366}), ver Figura 15 e 16.

Figura 16 – Alinhamento da sequência de aminoácidos traduzidas do Fshr de *A. altiparanae* com outras espécies representativas de diferentes ordens de teleosteos. Espaços marcados com um traço foram inseridos para melhorar o alinhamento dos resíduos de cisteína. O peptídeo sinal está indicado em negro e itálico. Os resíduos de cisteínas estão marcados em cinza e aqueles altamente conservados estão marcados com um asterisco. Os sítios de N-glicosilação preditos estão marcados em preto. As repetições imperfeitas de leucina estão delimitadas por um retângulo e os domínios transmembrana preditos estão sublinhados.

O cDNA completo para o *lhr* de *A. Altiparanae* consiste de 2590 nucleotídeos e é composto por uma região 5'UTR de 169 nucleotídeos, uma região codificante de 2130 nucleotídeos e por fim uma região 3'UTR de 292 nucleotídeos, incluindo a cauda poli A (Figura 17).

lhr e Lhr

```

ACTTTCCTCCAAACTCTTCAGTAAACTGAATTATTCCTGTCTTTAATTCGATTAAACCGTTTAAACAGAGTGGGTGTGGGAAAGACGTGTATGAGTGAGTT 101
CTGAGGGTCTATCGTGGAAACAGGGTAATAACTCGATTATAAAGAAGTAAAGTAGATCTGAAGACAATGAGGACATCTGCTCATCTCCAGCCTCT 201
M R T S L L I L S L L
CACGCGCTGCTGCTGCGGCTCTCTGCGCTTCGTGTGTCGCGAGGTCTGCGCGTGTCCGTGAAGACCATCTGCTGCACGAGGGCGACCGAGGGCGCGCA 301
T R C C C A S L R F V C P E V C R C S V K T I C C T R A T E A R A
GCCAAACACAGCGCTGTGACGAGCTTGTATTGAACCTACGTGCACCTGAAGAGTATCCAGTCTCAGCTTTGATGGAATGACGGGTGTTAAGAGAAATAG 401
A K H S A V S R L V L N Y V H L K S I P S L S F D G L T G V K R I
AAATAGCCAGAGTGTCACTCTCGAAACCATAGAGACCCGAGCCTTCATCAACCTCTCAACCTCTCAGAGATATCAATCCAAACACGAGAAGCCTGGT 501
E I A Q S V T L E T I E T R A F F I N L L N L S E I S I Q N T R S L V
TCATATTCACCAACGGGCTTCTACAATCTACCAAGCTGAGATATTTGAGCATCTCCAATACTGGAATAACTGTGTTTCTGATCTGACCTCCATTCT 601
H I H Q R A F Y N L P K L R Y L S I S N T G I T V F P D L T S I S
TCTCTGAAGTCTCTTTTCATGCTAGATATCTGTGACAACTCCACTTGCAGTCAATCCCAACAAACGGCCCTCACTGGAATGACGAGTGAAGACACACAA 701
S L E V S F M L D I C D N L H L Q S I P P N A L T G M T S E D T T
TGAATCTTTATAACAATGGCTTCAGAGAAATACAACCATGCGCTTCAATGAAGCAAAAATAGACACACTAATATTGAAGAACAAACCGAAACCTGCAGTC 801
M N L Y N N G F R E I Q H H A F N G T K I D T L I L K N N R N L Q S
AATCCACAGGGAGGCTTTTAGAGGAGCATCGGGCCCTACTGTATTGGATGTCTCTCCACAGCTCTAGAGACATTGCCCTCTCATGTTTACAGGCTGTT 901
I H R E A F R G A S G P T V L D V S S T A L E T L P S H G Q A V
CAGAAGCTGGTGGCTCTCTCGCTTCTCACTAAAGAGGCTCTCTCTCTAAACGGCCTGGAGAACCTGAGAGAAGCCCGGCTGACCTACCCAGCCACT 1001
Q K L V A R S A F S L K R L P P L N G L E N L R E A R L T Y P S H
GCTGTGCTTTACTCAGTGGAAACCCACAGGGAAGCCCTCTTCAGGACTGAGAAATGGATCTTCATAGTGTGAAGAGCAGAGCCCTGTTAGCTGTACG 1101
C A L L S W N T H R E A P S S G L R N G S S Y C E E Q S L L A V R
ATCAGGCGAAGCTTCAGTGTGATCCAAACATGGGTGAAGATCCTTTTTCATGTGCGGACCTTTTGGCACTGTGGATTTGAGTACCCAGAACTGGATTCC 1201
S G E A S S E N M G E D P F F M S G P F G T V D F E Y P E L D S
TGCCACAGAGGCGCTTCTCTTTGACGCCAGAGGCGATGCTTCAACCCCTGCGAGGACATTGGGATTGGGTTCTCGCGGTGGCCATCTGCT 1301
C Q T R P V L L C S P E A D A F N P C E D I V G F G F L R V A I W
TCATCAACATTTCTGGCAATCGTGGTAACCTGACCGTACTTCTGGTGTCTGCGCAGTGTGTAAGCTCACTGTCCCTCGCTTCTGATGTGTACCT 1401
F I N I L L A I A G N L T V L L V L F A S R C K L T V P R F L M C H L
GGCGTTTGAGATTTCTGCATAGGCGTGTACCTCCTGATGATCGCCACTGTGATCTGCGCACACGCGCCACTACAGCCAGCGCCATAGAATGGCAG 1501
A F A D F C I G V Y L L M I A T V D L R T R S H Y S Q H A I E W Q
ACGGGGGCGGGCTGCGGCTGCGCGGATTCTTGGCGTCTTTGGTGTGAATGTCTGTCTACACACTGTGCACCATCCCGTGAACGCTGGCACA 1601
T G A G C I A G F L A V F G G E L S V Y T L C T I T V E R L H T
TCACCCACGCTTTGCGTTTGGAGCGCAGGCTCGGCTGCCCAAGCCACTGCCATCATGGCTGCTGGGTGGGTGCTCTGCTTGGTCATGGCTCTGCTTCC 1701
I T H A L R L E R L G L P Q A T A I M A A G W V L C L V M A L L E
TTTAGTTGGCATCAGCAGCTACAGTAAGTCACTGTCTGCTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1801
L V G I S S Y S K V S M C L P M D I E T P L A Q S Y I I L L L F
AACGTGGGAGCTTTTCATAGTAATATGCGGCTGTACATGCGGATATACAGGCTGTACGCTACCCGAGGTGCGGGGGCGACCGCTGAGCGCTAAATCG 1901
N V G A F I V I C G C Y M R I Y T A V R Y P E V P G R T A D A K I
CAAAGCGCATGGCGTGTCTATCTTACAGATTTCTCTGATGGGCGCCCTCTCTCTTGGCATATCTGCTGCTTTAAGATACCGCTCATCAGT 2001
A K R M A V L I E T D F L C M A P I S F F A I S A A F K I P L I T V
CACCACCTCCAAGATCTCTGCTGCTCTCTATCCCATCAACTCTGCGCCAAACCTTTCTCTACGCCATCTTACCAAGGCTTCAGGAAGGACGCC 2101
T N S K I L L V L F Y P I N S C A N P F L Y A I F T K A F R K D A
TGCATGATGATGACACCATAGGCTGCTGTGAGAGCAAGCCAAACATGTACCGTATGAAGATGTACTGTTTCAAGAACGCTGGAAAAAGCAAAAGCAGCT 2201
C M M M S T I G C C E S K A N M Y R M K M Y C S E N A G K S S
CAGGCAGTAATCTCCACGCGCGCTCATGTGGCTGTCTCTCTCTCACCAGAAGCCACAGCTGAAGATAAAGAGCATAGAGAAAGACAGCAGTGA 2301
S G S K I R A V M W L S S S S H Q K P Q L K I K S I E K S S
AGGACATCTCACACTTCTTACATTTTTCATCTTTGTGTGCTATTGTATGGTGCATTATGTTAGCAAGTATCCCCCATCAGCGTTTTTATTAAGTAACT 2401
AGATTTTGAGTGTGGGAGAGGCTTTCAGAGGGAGATTTGTGAGTTATTTTCCCTCAGACAATGCGACTATTTTGTATGTACAGAGAGAGAGA 2501
AGAGACCACGATGACACGGAGCTGAGATGAGAGACTGGCAGCAAGGGTTGAGTCTATTGTTAAGACT poly(A)21 2591

```

Figura 17 – Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas do *lhr* de *A. altiparanae*. Os códons iniciador e finalizador estão marcados em cinza. O peptídeo sinal predito está em negrito. Os resíduos de cisteínas estão circulados. Os sítios de poliadenilação estão marcados em cinza escuro. Os sítios de N-glicosilação estão marcados em preto. Nove repetições imperfeitas ricas em leucina estão marcadas por retângulos. Os domínios transmembrana estão sublinhados. A numeração subscrita indica a extensão da cauda poli A.

Um sítio de poliadenilação (AAGAAA) foi detectado 74 nucleotídeos anteriores à cauda poli A. A tradução da região codificadora do *Lhr* resultou em uma proteína de 692 aminoácidos, precedida por um peptídeo sinal de 17 aminoácidos e apresentou um peso molecular de 76.4 kDa. Ainda, apresenta 27 resíduos de cisteína, dos quais 15 são altamente conservados (Figura 18) e 4 sítios de N-glicosilação (Asn^{98, 194, 297 e 387}).

Figura 18 – Alinhamento da sequência de aminoácidos traduzidas do *Lhr* de *A. altiparanae* com outras espécies representativas de diferentes ordens de teleosteiros. Espaços marcados com um traço foram inseridos para melhorar o alinhamento dos resíduos de cisteína. O peptídeo sinal está indicado em negro e itálico. Os resíduos de cisteínas estão marcados em cinza e aqueles altamente conservados estão marcados com um asterisco. Os sítios de N-glicosilação preditos estão marcados em preto. As repetições imperfeitas de leucina estão delimitadas por um retângulo e os domínios transmembrana preditos estão sublinhados.

As análises *in silico* das proteínas maduras mostraram que o *Fshr* e o *Lhr* de *A. altiparanae* apresentaram o mesmo padrão de organização da família dos receptores de hormônios glicoproteicos, com uma longa região N-terminal extracelular (ECD), seguida por um domínio transmembrana (TD) composto por sete segmentos transmembrana e por uma

curta cauda C-terminal (IT). O Fshr apresenta uma ECD de 335 aminoácidos, incluindo o peptídeo sinal, um TD de 263 aminoácidos e uma IT de 61 aminoácidos. Já o Lhr apresenta uma ECD de 257 aminoácidos, seguido por um TD de 226 aminoácidos e uma IT de 60 aminoácidos. Em ambos receptores, os TDs são ricos em aminoácidos hidrofóbicos, bem como nove repetições imperfeitas ricas em leucina (LRRs, motivo: LxxLxL) foram detectadas nas regiões ECDs.

As sequências do Fshr e Lhr apresentem 45% de identidade de aminoácidos entre si, principalmente na região TD. O Fshr apresentou a maior identidade de aminoácidos com a sequência anotada usando predição gênica de *Astyanax mexicanus* (85,2%), seguida pelos Siluriformes *Ictalurus punctatus* (77%) e *Tachysurus fulvidraco* (76%), e então com os Cypriniformes *Danio rerio* (76,1%) e Anguilliformes *Anguilla japonica* (69%).

De forma semelhante, o Lhr apresentou a maior similaridade de aminoácidos com a sequência de *Astyanax mexicanus* (79%), seguida pelos Siluriformes *Clarias gariepinus* (78.7%) e *Gobiocypris rarus* (72%). Ainda, apresentou 71% de identidade com os Cypriniformes *Danio rerio*, seguido pelos Perciformes *Dicentrarchus labrax* (64.2%) e *Epinephelus coioides* (64%).

A análise filogenética para o Fshr (Figura 19A) revelou o mesmo padrão encontrado na identidade de aminoácidos, ou seja, a sequência do Fshr de *A. altiparanae* está mais próxima de outros Characiformes, Siluriformes e Cypriniformes. O mesmo foi verificado para a sequência do Lhr (Figura 19B).

Figura 19 – Relações filogenéticas do Fshr (A) e Lhr de *A. altiparanae* com outras espécies de teleósteos. As árvores foram reconstruídas pelo algoritmo Neighbor-Joining com o emprego de 1000 replicatas. Os números indicam a porcentagem de semelhança. Somente os nós com mais de 50% de semelhança foram indicados. As sequências do receptor de hormônio glicoproteico tipo I (AY750688) e (AY750689) da lampreia *Petromyzon marinus* foram usados como grupos externos das árvores para o Fshr e Lhr, respectivamente. A marcação na barra corresponde a 5% de diferença entre as sequências.

4.6 Investigação da expressão dos receptores de gonadotropinas em diferentes órgãos

Dentre os diversos órgãos de *A. altiparanae* em que a possível expressão dos mRNAs para os receptores de gonadotropinas foi investigada, a expressão destes genes foi restrita às gônadas (Figura 20). Foi detectada uma expressão maior de *fshr* no testículo do que nos ovários, enquanto para o *lhr* não houve diferença significativa entre esses dois órgãos ($p < 0,001$). Na hipófise e no fígado foi detectada uma expressão não significativa de ambos os transcritos, enquanto nenhuma expressão foi detectada nos demais órgãos.

Figura 20 – Expressão relativa de *fshr* (A) e *lhr* (B) em vários órgãos de *A. altiparanae*. Asteriscos indicam diferenças significativas após o teste de Tukey. (***) denota um valor de $P < 0.001$.

4.7 Localização das proteínas Fshr e Lhr no ovário e testículo

Os anticorpos anti-Fshr e Lhr de *Solea senegalensis* produziram marcações específicas para estas proteínas nas gônadas de *A. altiparanae*. No ovário, a marcação para Fshr e Lhr estava presente a partir de oócitos perinucleolares até oócitos vitelogênicos. A marcação para ambas as proteínas foi localizada nas células foliculares e da teca (Figura 21). A marcação obtida para Fshr foi fraca e difusa (Figura 21B – D), já a marcação para Lhr foi mais intensa (Figura 21F – H).

No testículo, ambos os anticorpos apresentaram uma marcação intensa (Figura 22). A imunomarcação para Fshr foi detectada em células de Sertoli e em suas extensões citoplasmáticas que delimitam os cistos, mas também foi encontrada no interstício, presente nas células de Leydig (Fig. 22B – E).

A marcação para Lhr foi evidenciada principalmente nas células de Leydig, mas também foi observada nas células de Sertoli (Fig. 22G – I). Para confirmar estes resultados, foi empregada a técnica de imunofluorescência dupla para Fshr e Lhr, evidenciando que estas duas marcações se colocam no citoplasma das células de Sertoli e Leydig (Fig. 22 J – Q).

Figura 21 – Imunodeteção de Fshr (A – D) e Lhr (F – H) no ovário de *A. altiparanae*. Oócitos vitelogênicos (Vo), oócitos alvéolo cortical (Ca) e oócitos perinucleolares (Po). Escala: 100 μ m (A, E, F), 20 μ m (B – D, G,H).

Figura 22 – Detecção de Fshr (A – E) e Lhr (F – I) por imunoperoxidase e imunofluorescência dupla (J – K) no testículo de *A. altiparanae*. (J, N) Imagens de epifluorescência. (K, O) Imunomarcacão com anti- *S. senegalensis* Fshr marcado com Alexa 488 (fluorescência verde). (L, P) Imunomarcacão com anti- *S. senegalensis* Lhr marcado com Alexa 594 (fluorescência vermelha). A fluorescência de cada marcação e as imagens sobrepostas (M, Q) mostram que estas são derivadas dos mesmos cortes. Escala: 100 μ m (A, B, F), 50 μ m (J – Q), 20 μ m (C – E, G – I).

4.8 Parâmetros reprodutivos nas fêmeas e machos durante o ciclo reprodutivo em cativeiro

Os espécimes de *A. altiparanae* utilizados neste estudo foram mantidos em cativeiro e amostrados durante seu primeiro ciclo reprodutivo, de setembro de 2012 a julho de 2013. Nas fêmeas, o IGS (Figura 23A) variou significativamente durante o ano ($p < 0.05$) e teve um pico em janeiro de 2013, sugerindo que a estação reprodutiva desta espécie ocorre durante o verão no Brasil. Embora estas fêmeas não tenham sido induzidas ao processo de reprodução induzida e, portanto, não tenham desovado, foi observada uma redução do IGS após a estação reprodutiva e este retornou aos mesmos valores observados no início da amostragem do estudo (setembro de 2012). De forma oposta, não foram observadas variações no IHS durante todo o período analisado (Figura 23B).

Figura 23 – Índices gonadossomático (A), Hepatossomático (B) e cortes histológicos representativos dos ovários de fêmeas adultas de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo anual em cativeiro, de setembro de 2012 a julho 2013. Meses que apresentam a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,5$). O IGS variou significativamente ao longo do ano, ao passo que o IHS não. Note que oócitos vitelogênicos (Vo) estão presentes durante todos os meses amostrados, enquanto nenhum folículo pós-ovulatório é observado. Oócitos atrésicos (Ao), oócitos alvéolo cortical (Ca) e oócitos perinucleolares (Po). Escala: 500 μ m.

Em relação à dinâmica ovariana, foram observados oócitos vitelogênicos durante todo o período estudado (Figura 23C – H) e, desta forma, as fêmeas foram classificadas na fase apta à desova durante todo o ciclo reprodutivo. Já os oócitos alvéolos-corticais foram detectados de setembro de 2012 até março de 2013 (Fig. 23C – F), evidenciando que diferentes parcelas de oócitos são recrutadas ao processo de vitelogênese durante a estação reprodutiva, indicando que esta espécie apresenta desova parcelada. Os oócitos perinucleolares foram observados a partir de maio de 2013 (Figura 23G), marcando o início de um novo ciclo reprodutivo. Poucos oócitos atrésicos foram observados nos espécimes analisados durante todo o ciclo reprodutivo. Ainda, nenhum complexo pós-ovulatório foi encontrado, indicando que as fêmeas de *A. altiparanae* são incapazes de atingir naturalmente a maturação final dos oócitos, ovulação e desova durante a estação reprodutiva quando mantidas em cativeiro.

Durante o ciclo reprodutivo em cativeiro, os machos de *A. altiparanae* apresentaram uma variação discreta do IGS (Fig. 24A). O IGS apresentou-se constante durante a maior parte do ciclo reprodutivo e só foi observada uma redução no mês de maio de 2013 ($p < 0,05$). A seguir, retorna aos valores observados nos meses anteriores. Nenhuma variação significativa foi observada no IHS ao longo de todo o ciclo reprodutivo (Fig. 24B).

Figura 24 – IGS (A), IHS (B) e cortes histológicos representativos dos testículos (C–H) dos machos adultos de *A. altiparanae* analisados durante o ciclo reprodutivo anual em cativeiro. Interstício (asteriscos), espermatogônias (seta), espermatócitos (St), espermatozoides (Sz), lúmen testicular (Lu). Escala: 50 μ m.

Após a análise da histologia dos testículos, os animais avaliados foram classificados em quatro fases reprodutivas, segundo os critérios de Brown-Peterson et. al. (2011), conforme descritos a seguir.

Em setembro de 2012 (Figura 24C) os animais se encontravam na fase de desenvolvimento, caracterizados pela presença de túbulos com epitélio germinativo (EG) contínuo, cistos em diversos estágios de espermatogênese, poucas espermatogônias entre os cistos, luz dos túbulos reduzida, com pequeno número de células livres.

Em novembro de 2012 (Figura 24D) os animais ainda se encontravam na fase de desenvolvimento, porém já foi observada a presença de cistos em estágios mais finais do processo de espermatogênese e maior quantidade de espermatozoides nos túbulos seminíferos. Em janeiro de 2013 (Figura 24E) foi observada a fase de apto à desova, subfase epitélio germinativo (EG) médio, ainda com a presença de cistos em diversos estágios de espermatogênese, porém, com túbulos seminíferos maiores, com maior quantidade de espermatozoides e secreção abundante.

Em março de 2013 (Figura 24F) foi observada a fase de apto à desova, subfase EG final, uma vez que a maior parte dos testículos era ocupada por EG descontínuo, raros cistos espermatogênicos, grande número de células livres (espermatozoides/espermátides) imersas em abundante secreção e encontradas na luz do túbulo muito dilatada. Também foi detectada a presença de um epitélio secretor (dado não mostrado). Em maio de 2013 (Figura 24G), os animais se encontravam na fase de regressão, caracterizada pela desorganização dos túbulos seminíferos, aumento do espaço ocupado pelo interstício, reabsorção de espermatozoides residuais e início da repopulação do EG por espermatogônias.

Por fim, em julho de 2013, foi observada a fase de regeneração (Figura 24H), com a presença de um EG formado predominantemente por espermatogônias ainda individualizadas, presença de alguns cistos nas fases iniciais da espermatogênese e interstício bem desenvolvido.

4.9 Expressão temporal dos mRNAs para as gonadotropinas na hipófise das fêmeas e machos

Nas fêmeas, durante o período analisado, não ocorreram alterações significativas ($p>0,05$) nos níveis dos transcritos para *gpha* (Figura 25A).

Figura 25 – Expressão relativa dos mRNAs para *gpha* (A), *fshb* (B) e *lhb* (C) nas fêmeas adultas de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro, de setembro de 2012 a julho de 2013. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados em julho de 2013 (coluna branca). Asteriscos denotam diferentes níveis de significância após o teste de Tukey, *($p<0,05$) e **($p<0,01$).

Por outro lado, os maiores níveis de transcritos para *fshb* (Figura 25B) foram detectados nos espécimes em novembro de 2012. Após isso, os níveis destes transcritos apresentaram uma redução acentuada ($p < 0,01$) em janeiro de 2013 e então se tornam constantes até março de 2013. Então, os transcritos para *fshb* iniciaram um aumento gradual até o último mês analisado, julho de 2013 ($p < 0,05$).

Os níveis dos transcritos para *lhb* (Figura 25C) não apresentaram alterações marcantes durante o ciclo reprodutivo. A expressão deste gene foi constante durante a maior parte do ano, com exceção de uma redução observada em Novembro de 2012 ($p < 0,05$) e em janeiro de 2012 ($p < 0,01$). Não foi detectado aumento progressivo ou pico de *lhb* durante a estação reprodutiva (novembro de 2012 a março 2013), nas condições experimentais analisadas.

Nos espécimes machos, a expressão dos mRNAs para a *gpha* se manteve baixa na maior parte do ciclo reprodutivo (Figura 26A), com exceção do mês de setembro de 2012, quando apresentou seu maior nível. A seguir, os níveis começam a decrescer em novembro 2012 ($p < 0,5$) e janeiro 2013 ($p < 0,001$) e continuaram baixos até julho de 2013. Em relação à expressão do *fshb* (Figura 26B), foi observado um aumento de setembro de 2012 a janeiro de 2013 ($p < 0,01$), quando os maiores níveis deste transcrito foram detectados. A seguir, ocorreu uma diminuição dos níveis até o final do período amostrado ($p < 0,001$), em julho de 2013. Curiosamente, os níveis de expressão de *lhb* relembram o mesmo padrão observado para a *gpha* (Figura 26C). A maior expressão de *lhb* foi detectada em setembro de 2012. Nos meses seguintes foi observado um decréscimo ($p < 0,005$ e $p < 0,01$) da expressão de *lhb* até março de 2013.

A **B** **C**

Figura 26 – Expressão relativa dos mRNAs para *gpha* (A), *fshb* (B) e *Lhb* (C) em machos adultos de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro, de setembro de 2012 a julho de 2013. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados em julho de 2013 (coluna branca). Asteriscos denotam diferentes níveis de significância após o teste de Tukey, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

4.10 Expressão temporal dos mRNAs para os receptores de gonadotropinas nas gônadas de fêmeas e machos

Nos ovários de *A. altiparanae*, os níveis de expressão de *fshr* (Figura 27A) foram mantidos altos e constantes durante a estação reprodutiva. Após esse período, observou-se uma redução nos níveis dos transcritos para *fshr* em Maio ($p<0,01$) e Julho de 2013 ($p<0,05$).

Figura 27 – Expressão de mRNAs para *fshr* e *lhr* nos ovários de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro. Os dados estão expressões como média $\pm$ erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados em janeiro de 2013 (coluna branca). Asteriscos denotam diferentes níveis de significância após o teste de Tukey, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$).

Por outro lado, os níveis de *lhr* nos ovários (Fig. 27B) estavam reduzidos em setembro de 2012 e aumentaram nos meses seguintes ($p<0,01$) durante a estação reprodutiva, exibindo um pico em janeiro de 2012 ($p<0,001$), o que corresponde ao pico do IGS nestes animais (Figura 24A). A seguir, os níveis dos transcritos para *lhr* tornaram-se reduzidos e constantes ($p<0,05$).

Nos testículos, os níveis de mRNAs para *fshr* estavam constantes durante a maior parte do ciclo reprodutivo, com a exceção de março de 2013, quando o maior nível de expressão desse transcrito foi detectado (Figura 28A). Em relação à expressão de *lhr*, os níveis de expressão deste gene também apresentaram-se contantes, com e excessão de maio de 2013, em que foi observado uma redução nos níveis deste transcrito (Figura 28B).

Figura 28 – Expressão de mRNAs para *fshr* e *lhr* nos testículos de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro. Asteriscos denotam diferentes níveis de significância após o teste de Tukey, *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

4.11 Níveis plasmáticos de esteroides sexuais nas fêmeas e machos

Nas fêmeas de *A. altiparanae*, o E_2 e a 17α , 20β -DHP foram detectados no plasma durante todo o período avaliado (Figura 29). Entretanto, não foram observadas variações significativas nos níveis plasmáticos de ambos esteroides ao longo do ciclo reprodutivo ($p > 0,05$), (Figura 29).

Figura 29 – Níveis plasmáticos de E_2 (A) e 17α , 20β -DHP (B) em fêmeas adultas de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo anual em cativeiro, de setembro de 2012 a julho de 2013. Os dados estão expressões como média $\pm$ erro padrão da média e os meses que compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas após o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Já nos machos, foram quantificados os níveis plasmáticos de testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-kt). Ambos os hormônios também foram detectados em todo o período analisado (Figura 30).

Figura 30 – Níveis plasmáticos de T e 11-kt em machos adultos de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro de setembro de 2012 a julho de 2013. Os dados estão expressões como média $\pm$ erro padrão da média. Os meses com letras diferentes apresentam diferenças estatísticas após o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em setembro de 2012, os níveis de T estavam baixos (Figura 30A), mas a seguir, em novembro de 2012, foi observada a maior concentração plasmática de testosterona ($p < 0,05$). A partir de então, os níveis de T diminuem e se tornaram constantes a partir de março até julho de 2013. Os níveis plasmáticos de 11-kt (Figura 30B) apresentaram a mesma cinética que os de T. Inicialmente estão baixos e ocorreu um pico em novembro de 2012 ($p < 0,05$), sendo observada uma diminuição nos meses seguintes. Os níveis de 11-kt encontrados no plasma dos machos durante todo o ciclo reprodutivo eram cerca de 10 vezes maiores que os níveis de T.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização molecular das subunidades das gonadotropinas e seus receptores

A clonagem e o sequenciamento dos cDNAs das subunidades das gonadotropinas em peixes é uma etapa inicial para uma gama de estudos básicos e aplicados. Permite (1) a realização de análises filogenéticas e outros estudos moleculares (QUERAT; SELLOUK; SALMON, 2000), (2) a produção de gonadotropinas recombinantes e estudos em sua estrutura, (3) estudos sobre os efeitos das gonadotropinas recombinantes *in vitro* e *in vivo* (ZMORA et al., 2007), (4), a produção de anticorpos contra essas proteínas (LI et al., 2005), (5) bem como a sua aplicação na aquicultura (MYLONAS et al., 2010).

Existem alguns relatos recentes sobre o isolamento parcial das subunidades beta das gonadotropinas de duas espécies da ordem Characiformes, *Salminus hillari* (MOREIRA et al., 2015) e *Piaractus mesopotamicus* (KURADORUMI et al., 2015). Entretanto, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo descrevendo a clonagem e a caracterização molecular dos cDNAs completos para as subunidades *gpha*, *fshb* e *lhb* em uma espécie representante dos Characiformes, *A. altiparanae*. Nossos achados confirmam a presença de duas gonadotropinas distintas também neste grupo de peixes, o qual apresenta importância ecológica, econômica e evolutiva.

Nas sequências primárias das subunidades das gonadotropinas de *A. altiparanae*, foi reconhecida uma série de resíduos de cisteína conservados. É sabido que estes resíduos interagem durante o estabelecimento de pontes dissulfeto e na formação de *loops*, essenciais para a determinação da estrutura terciária destas glicoproteínas (VITT et al., 2001). Devido estas características, as subunidades das gonadotropinas são membros da *cystine knot family*, um grupo de proteínas extracelulares que interagem com seus receptores específicos ou outras proteínas extracelulares (HEARN; GOMME, 2000).

A análise da estrutura primária das subunidades *Gpha*, *Fshb* e *Lhb* em *A. altiparanae* revelou a presença de 10, 13 e 12 resíduos de cisteína, respectivamente. A presença de 10 resíduos de cisteína na subunidade *Gpha* e de 12 resíduos na subunidade

Lhb são características altamente conservadas entre os teleósteos e os mamíferos. Estes resíduos também estão localizados em posições conservadas nestas proteínas e formam cinco e seis pontes dissulfeto intramoleculares na Gpha e Lhb, respectivamente (LEVAVI-SIVAN et al., 2010; SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003).

Por outro lado, na subunidade Fshb, o número de resíduos de cisteína parece ser menos conservado. As sequências encontradas em peixes de grupos basais como elasmobrânquios (QUERAT et al., 2001), condrósteos (QUERAT; SELLOUK; SALMON, 2000) e enguias (DEGANI et al., 2003) apresentam 12 resíduos de cisteína, similar ao encontrado nos tetrápodos. Entretanto, Siluriformes e Cypriniformes, com a exceção de *Danio rerio* (Cypriniformes) (SO et al., 2005), apresentam uma cisteína adicional na região N-terminal desta subunidade (CHANG et al., 1988; LIU; KIM, KARSI, 2001; VISCHER et al., 2003; YOSHIURA et al., 1997), resultando em um total de 13 resíduos de cisteína.

Estes dados corroboram evidências de que a presença de 13 resíduos de cisteína é uma característica exclusiva das cadeias de Fshb em espécies das superordem Ostariophysi (LEVAVI-SIVAN et al., 2010), o que provavelmente resultou na criação de outro sítio de clivagem do peptídeo sinal nestas espécies (SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003). Similarmente ao encontrado em *Clarias gariepinus* (VISCHER et al., 2003), em *A. altiparanae* o resíduo de cisteína extra na cadeia do Fshb é localizado quatro amino ácidos após o primeiro resíduo altamente conservado presente na região N-terminal.

A ancoragem de glicosilações é essencial para a conformação tridimensional, separação, armazenamento intracelular, reconhecimento e ativação do receptor, bem como nas taxas de *clearance* dos hormônios glicoprotéicos (HEARN; GOMME, 2000). Como observado em outros peixes e mamíferos, as subunidades Gpha e Lhb de *A. altiparanae* apresentam, respectivamente, dois e um sítios de N-glicosilação muito conservados. Por outro lado, a subunidade Fshb tem apenas um sítio de N-glicosilação predito, localizado na região N-terminal. No geral, a cadeia do Fshb apresenta mais variações em relação ao número de sítios de N-glicosilação em relação às demais subunidades das gonadotropinas.

A subunidade Fshb de peixes primitivos contém dois potenciais sítios de N-glicosilação, enquanto somente um único sítio tem sido detectado nas sequências de Fshb das ordens of Cypriniformes (SO et al., 2005; YOSHIURA et al., 1997), Perciformes (MATEOS et al., 2003), Salmoniformes (SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003), Siluriformes (VISCHER et al., 2003) e também em Characiformes, como visto neste estudo. Todavia, nenhum sítio de N-glicosilação tem sido observado nas cadeias de Fshb de algumas espécies, como em *Hippoglossus hippoglossus* (Pleuronectiformes; WELTZIEN; NORBERG; SWANSON, 2003), em *Anaploma fimbria* (Scorpaeniformes; GUZMÁN; LUCKENBACH; SWANSON, 2013), em *Sebastes schlegelii* (Scorpaeniformes, KIM; CHO; SOHN, 2005) bem como em *Epinephelus coioides* (Perciformes; LI et al., 2005).

Em comparação com as subunidades Gpha e Lhb, a subunidade Fshb apresenta uma menor identidade de aminoácidos com as sequências homólogas de outras espécies de teleósteos de diversas ordens. Este padrão sugere uma diversificação mais rápida da subunidade Fshb em relação às demais subunidades ao longo da evolução dos teleósteos (QUERAT; SELLOUK; SALMON, 2000; VISCHER et al., 2003). Todavia, isso já era esperado, uma vez que é bem estabelecido que a sequência primária do Fshb é pouco conservada neste grupo (LEVAVI-SIVAN et al., 2010), mesmo em regiões que interagem com seu receptor cognato. Isto poderia resultar em diferenças na natureza da interação com seu receptor, na estabilidade do heterodímero e provavelmente, na intensidade dos efeitos biológicos exercidos pelo Fsh em diferentes espécies (SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003). Desta forma, So et al. (2005) afirmam que a baixa conservação na sequência da subunidade Fshb deve implicar em divergência funcional, sugerindo que mais estudos sobre as funções do Fsh em diferentes grupos de teleósteos são necessários.

Assim como para as gonadotropinas, nos últimos anos têm crescido o número de estudos envolvendo os receptores de gonadotropinas nas mais diversos grupos e espécies de teleósteos. A presença de distintos receptores de gonadotropinas em uma mesma espécie tem sido confirmada pela clonagem molecular e/ou purificação destas proteínas em representantes das ordens Anguilliformes (KAZETO et al., 2012), Atheriniformes (SHINODA

et al., 2010), Cypriniformes (BASU; BHATTACHARY, 2002; SO et al., 2005); Cyprinodontiforme (OHKUBO et al. 2013), Gadiformes (MITTELHOLZER et al., 2009), Perciformes (NYUJI et al., 2013, ROCHA et al., 2007), Pleuronectiformes (CHAUVIGNÈ et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2008), Salmoniformes (ANDERSSON et al., 2009; OBA et al. 1999a,b), Scorpaeniformes (GUZMÁN; LUCKENBACH; SWANSON, 2013; MU et al., 2013), Siluriformes (VISCHER; BOGERD, 2003) e agora com nosso estudo, também nos Characiformes.

Nosso estudo é pioneiro na clonagem e caracterização dos cDNAs completos para o *fshr* e *lhr* em uma espécie da Ordem Characiformes, *A. altiparanae*, o que permitirá uma gama de futuros estudos moleculares e fisiológicos nesta espécie. Em relação a espécies neotropicais, existe apenas um segundo estudo sobre a caracterização dos receptores de gonadotropinas na espécie *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes) (SHINODA et al., 2010)

A análise da sequência primária do Fshr e Lhr de *A. altiparanae* mostrou que as mesmas apresentam características típicas dos receptores de hormônios glicoprotéicos, como um longo domínio extracelular N-terminal (ECD), um domínio transmembrana (TD) e um curto domínio intracelular C-terminal (IT) (LEVAVI-SIVAN et al., 2010). O domínio ECD representa a maior parte da proteína e apresenta como característica várias repetições ricas em leucina (LRR), as quais estão envolvidas na interação proteína/proteína. As sequências Fshr e Lhr de *A. altiparanae* apresentam 9 LRRs em suas regiões terminais, característica bem conservada entre os vertebrados (LEVAVI-SIVAN et al., 2010).

Entretanto, no Fshr de algumas espécies de Gadiformes (Mittelholzer et al. 2009), Perciformes (ROCHA et al., 2007), Pleuronectiformes (KOBAYASHI; ANDERSEN, 2008) e Scorpaeniformes (GUZMÁN; LUCKENBACH; SWANSON, 2013) existe uma LRRs extra na região N-terminal, totalizando assim 10 LRRs (MAUGARS; SCHMITZ, 2006; ROCHA et al., 2007), ou até mesmo 11 LRRs (Perciformes) (NYUJI et al., 2013). Isto poderia alterar a extensão e dobramento desse domínio de ligação com o hormônio, alterando seu potencial

de reconhecimento hormonal, especificidade ou as propriedades de ativação nestas espécies (GUZMÁN; LUCKENBACH; SWANSON, 2013).

A ordem Characiformes consiste de aproximadamente duas mil espécies, com três famílias africanas e 14 famílias neotropicais (NELSON, 2006) e as relações filogenéticas dentro desta ordem ainda são um pouco controversas (OLIVEIRA et al., 2011). Baseados em caracteres morfológicos e dados moleculares, a hipótese filogenética atualmente aceita indica que à Ordem Characiformes formam um grupo irmão de um clado composto por Siluriformes e Gymnotiformes e estas três ordens são um clado irmão de Cypriniformes (DIMMICK; LARSON, 1996).

As análises filogenéticas das subunidades das gonadotropinas de *A. altiparanae* foram realizadas com as sequências homólogas de 26 espécies representativas de 12 ordens, ao passo que para os receptores de gonadotropinas foram utilizadas sequências de 30-31 espécies de 12 ordens. Tais análises corroboram as relações filogenéticas atuais para a superordem Ostariophysi, como descrito acima.

5.2 Expressão celular e tecidual das subunidades das gonadotropinas e seus receptores

Na tentativa de detectar outros locais além da hipófise que expressam os mRNAs para as subunidades das gonadotropinas em *A. altiparanae*, foi realizado uma análise em diferentes órgãos e tecidos de fêmeas e machos adultos por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Entretanto, foi verificado que a expressão destes mRNAs está restrita à hipófise, a semelhança de outras espécies como *Ctenopharyngodon idella* (Cypriniformes)(ZHOU et al., 2010) and *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes)(CERDÁ et al., 2008).

Além da hipófise, a expressão dos mRNAs das gonadotropinas tem sido detectada no encéfalo (ELISIO et al., 2012; PANDOLFI et al., 2006; PARHAR et al., 2003; SO et al., 2005), no ovário (ELISIO et al., 2012; HUANG et al., 2009; PANDOLFI et al., 2006; SO et al., 2005; WU et al., 2009), bem como no testículo (ELISIO et al., 2012; HUANG et al., 2009; SO

et al., 2005). Ainda, uma expressão inesperada destas subunidades já foi encontrada em órgão e tecidos que não participam do eixo HPG, como no rim, músculo fígado, brânquias e fígado de *Danio rerio* (Cypriniformes)(SO et al. 2005) e no baço, rim e brânquias de *Anguilla marmorata* (Anguilliformes)(HUANG et al., 2009).

Estes achados sugerem que as gonadotropinas extra-hipofisárias podem atuar como fatores autócrinos ou parácrinos no ajuste fino do eixo HPG, embora suas funções exatas ainda sejam desconhecidas (LEVAVI-SIVAN et al., 2010). Nossos dados, juntamente com aqueles obtidos por Zhou et al. (2010) e Cerdá et al. (2008), provém evidências que as gonadotropinas extra-hipofisárias podem ser espécie-específica, levando nos especular que isto pode não ser uma fenômeno universal entre os vertebrados, como assumido por So et al. (2005).

No presente trabalho, também investigamos a expressão celular dos mRNAs das subunidades das gonadotropinas na hipófise de *A. altiparanae* por meio da técnica de hibridização *in situ*. Os sinais para as subunidades *gpha* e *lhb* estavam distribuídos por toda PPD, ao passo que o sinal para *fshb* era localizado em pequenos grupos nesta região. Embora as hibridizações para cada sonda fossem realizadas em cortes subsequentes, os resultados obtidos não nos permitiram tecer conclusões sobre a dualidade das células gonadotrópicas por este método.

Segundo revisão de Agulleiro, García-Hernandez e García-Ayala (2006), alguns resultados conflitantes sobre a dualidade das células gonadotrópicas têm sido obtidos em diversas espécies com o emprego de anticorpos heterólogos. Apenas a utilização de anticorpos homólogos ou de sondas específicas tem permitido identificar de forma precisa populações individuais de células gonadotrópicas que expressam Fsh ou Lh em algumas espécies (NAITO et al., 1991; NOZAKI et al., 1990; SHIMIZU et al., 2003a;c; SO et al., 2005; WELTZIEN; NORBERG; SWANSON, 2003), bem como uma terceira população de células gonadotrópicas que expressam ambos as subunidades/hormônios (CERDÁ et al., 2008; GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2002; VISCHER et al., 2003).

Até este estudo, não existiam anticorpos contra as subunidades das gonadotropinas de espécies neotropicais. Assim, os estudos prévios sobre a caracterização das células gonadotrópicas em espécies de Characiformes foram conduzidos com o uso de anticorpos heterólogos (BORELLA et al., 1997; HONJI et al., 2013; JESUS et al., 2014). Os anticorpos ora desenvolvidos especificamente contra peptídeos originados das subunidades Fhsb e Lhb de *A. altiparanae* permitiram caracterizar a distribuição destes tipos celulares na hipófise, a qual está de acordo com o padrão observado na revisão de Agulleiro, García-Hernandez, García-Ayala (2006). Ainda, demonstram a presença da dualidade das células gonadotrópicas em uma espécie da Ordem Characiformes, ampliando os dados disponíveis nesta área.

Uma vez que as gonadotropinas controlam a gametogênese e a esteroidogênese gonadal, por consequência, os testículos e ovários são os principais sítios de expressão de *fshr* e *lhr* também nos teleósteos (LEVAVI-SIVAN et al., 2010; SCHULZ et al., 2010). Em *A. altiparanae*, as análises de qPCR demonstraram que a expressão de ambos os transcritos foi restrita e abundante nas gônadas. Entretanto, vários estudos empregando esta metodologia (mais sensível) ou até mesmo o RT-PCR têm detectado a expressão extragonadal dos mRNAs para *fshr* e *lhr*.

Em *Gadus morhua* (Perciformes), ambos transcritos foram detectados no encéfalo de machos e fêmeas e nas brânquias dos machos. Também, uma baixa expressão de *fshr* foi observada no tecido muscular e no baço dos machos, ao passo que para o *lhr* essa mesma condição foi detectada no intestino e no fígado dos machos (MITTELHOLZER et al., 2009). Já em *Anguilla Anguilla* (Anguilliformes), os transcritos para *fshr* também foram encontrados em altos níveis no cérebro anterior (KAZETO et al., 2012). Em *Clarias gariepinus* (Siluriformes), além das gônadas, uma alta expressão de *fshr* foi observada na vesícula seminal, uma vez que nesta espécie este órgão apresenta um epitélio revestido por células homólogas às células de Sertoli (BOGERD et al., 2001). Ainda, nesta espécie, os transcritos para *lhr* também foram encontrados no rim cefálico (órgão homólogo a glândula

adrenal), bem como no músculo, cerebelo, estômago, coração e vesícula seminal (VISCHER; BOGERD, 2003).

Embora a expressão extragonadal dos receptores de gonadotropinas tem sido observada em um número cada vez maior de espécies, as propriedades biológicas destes receptores em tais órgãos ainda permanecem desconhecidas. Da mesma forma, os efeitos das gonadotropinas em órgãos extra-gonadais, assim com a expressão extra-hipofisária das gonadotropinas merecem ser melhor investigadas nas espécies onde esse fenômeno acontece.

No presente trabalho, também investigamos quais tipos celulares expressam os receptores de gonadotropinas nos ovários e testículos de *A. altiparanae*. Ao nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo desta natureza realizado em uma espécie de teleósteo neotropical. Entretanto, ressaltamos que existem poucos estudos nessa área, o que acreditamos ser uma consequência da baixa disponibilidade de anticorpos produzidos contra estas proteínas em teleósteos, e ainda, pela dificuldade da detecção destes transcritos pela técnica de hibridização *in situ*, problema este que também enfrentamos durante a realização deste trabalho.

Para contornar esta dificuldade, utilizamos anticorpos produzidos contra os peptídeos do Fshr e Lhr de *Solea senegalensis* (Perciformes), uma vez que um estudo anterior realizado por Chauvigné et al., (2014) demonstrou que o anti- *S. senegalensis* Lhr também reconheceu este receptor nos testículos de duas espécies filogeneticamente mais basais, *Sparus aurata* (Perciformes) e *Danio rerio* (Cypriniformes), devido a alta homologia presente na região C-terminal nas sequências destas espécies com os peptídeos utilizada na produção dos anticorpo. Da mesma forma, após a análise da homologia das sequências do Fshr e Lhr de *A. altiparanae* com os peptídeos utilizados na produção do anti-Fshr e Lhr de *Solea senegalensis*, pressupomos que estes também poderiam reconhecer os receptores de gonadotropinas em *A. altiparanae*.

Em *A. altiparanae*, ambos os receptores de gonadotropinas foram imunolocalizados nas células foliculares e da teca de oócitos perinucleolares até oócitos vitelogênicos. Em

espécies de desova total, como em *Salmo salar* (Salmoniformes), análises de *hibridização in situ* apenas em oócitos vitelogênicos revelaram que o *fshr* e *lhr* são expressos tanto nas células foliculares como nas da teca, embora a marcação para *lhr* fosse mais fraco nas células da teca de oócitos vitelogênicos maiores (ANDERSSON et al., 2009).

Já os estudos em espécies com desova parcelada têm apresentado resultados diferentes. Em *Scomber japonicus* (Perciformes), esta mesma técnica revelou que os transcritos para *fshr* são expressos nas células pré-foliculares e foliculares de oócitos perinucleolares e álvelo-corticais. Já nos oócitos vitelogênicos, ambos transcritos são expressos nas células foliculares e da teca (NYUJI et al., 2013). Em *Dicentrarchus labrax* (Perciformes), a presença de *fshr* foi detectada na parede do folículo ovariano, mas não possível individualiza as camadas que apresentam tal marcação (ROCHA et al., 2007). Em *Hippoglossus hippoglossus* (Pleuronectiformes), o sinal para *fshr* foi detectado nas células foliculares de oócitos em crescimento primário e em oócitos vitelogênicos, ao passo que o *lhr* parece ser expresso em ambas camadas (KOBAYASHI et al., 2008).

O presente estudo, ao que se sabe, é o primeiro a empregar a técnica de imunohistoquímica na localização dos receptores de gonadotropinas nos ovários de teleósteos. Nossos dados corroboram a presença de *fshr* em ambos componentes da parede folicular. A presença de Fshr nas células foliculares já era esperada, uma vez que estas células atuam no transporte de vitelogenina para o oócito mediante ação do Fsh (TYLER et al., 1997). Por outro lado, a expressão de Fshr nas células da teca pode estar relacionada ao processo de esteroidogênese gonadal que envolve a atuação mútua destas camadas, uma vez que o Fsh também atua como um potente indutor da esteroidogênese gonadal (PLANAS et al., 2000).

Nos testículos, além da expressão esperada de Fshr nas células de Sertoli, alguns estudos têm demonstrado a presença da expressão gênica (*fshr*) ou proteica (Fshr) deste receptor também nas células de Leydig, em espécies como *Anguilla japonica* (Anguilliformes) (OHTA et al., 2007), *Clarias gariepinus* (Siluriformes) (GÁRCIA-LOPES et al., 2009), *Danio rerio* (Cypriniformes) (GARCÍA-LÓPEZ et al., 2010) e em *Solea senegalensis*

(Pleuronectiformes) (CHAUVIGNÉ et al., 2012). Em *A. altiparanae*, também observamos a expressão proteica de Fshr tanto nas células de Sertoli quanto nas células de Leydig, corroborando as evidências de que produção de andrógenos mediada pelo Fsh pode ser um mecanismo conservado nos teleósteos (SCHULZ et al., 2010).

Desta forma, sugere-se que Fsh sozinho pode regular a atividade das células de Leydig e Sertoli ao longo das etapas iniciais até a metade do ciclo espermatogênico, quando os níveis plasmáticos de Lh são muito reduzidos ou indetectáveis em espécies de reprodução sazonal (GARCIA-LOPEZ et al., 2010). Entretanto, acreditamos que estudos funcionais ainda devem ser conduzidos em *A. altiparanae* de modo a comprovar se o Fsh também é um potente indutor da estereoidogênese testicular, como já observado em outras espécies (LEVAVI-SIVAN et al., 2010).

Em relação à célula de Sertoli, também foi demonstrada a expressão de *lhr* neste tipo celular em *Danio rerio* (Cypriniformes, GARCIA-LOPEZ et al., 2010), fato também observado em *A. altiparanae*. Ainda, recentemente, também foi detectada a expressão proteica de Lhr nas espermatídes de *Danio rerio*, em *Sparus aurata* (Perciformes) e em *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes), (CHAUVIGNÉ et al., 2014). Nesta última espécie, a qual apresenta espermatogênese semi-cística, a incubação das espermatídes isoladas do lúmen testicular com Lh promoveu a sua diferenciação em espermatozoides, a partir da indução de transcrição de genes potencialmente envolvidos na função dos espermatozoides (CHAUVIGNÉ et al.; 2014).

Nesse contexto, Garcia-Lopez et al., (2010) discute que uma vez que as gonadotropinas controlam a função testicular por meio da ativação de seus receptores nos vertebrados, incluindo os teleósteos, o conhecimento sobre a identidade e características dos tipos celulares no testículos que respondem as gonadotropinas, ou seja, que apresentam seus receptores, é crucial para o entendimento de como as gonadotropinas regulam a função testicular, e esse tipo de informação ainda não existe para a maioria das espécies.

5.3 Perfis de expressão gênica das subunidades das gonadotropinas e dos receptores de gonadotropinas, e níveis plasmáticos de esteroides sexuais ao longo do ciclo reprodutivo em cativeiro

Uma vez que, ao que consta, não existem imunoenaios disponíveis para quantificar os níveis plasmáticos de gonadotropinas em espécies neotropicais, no presente estudo, a atividade do eixo hipotálamo hipófise gônadas de fêmeas e machos de *A. altiparanae* criados em cativeiro foi analisada por meio dos perfis de expressão gênica das subunidades das gonadotropinas e seus receptores, em conjunto com os níveis de esteroides sexuais, os quais foram determinados bimensalmente durante um ciclo reprodutivo anual, de setembro de 2012 a julho de 2013.

Nas fêmeas, os níveis dos transcritos para *fshb* apresentaram alterações significativas ao longo do ciclo/ano. Os maiores níveis de transcrição foram detectados em novembro de 2012, concomitantes ao aumento gradual do IGS e seu pico em janeiro de 2013. É sabido que o Fsh tem duas principais funções durante o desenvolvimento ovariano, estimulando a proliferação das oogônias, bem como a vitelogênese (LUBZENS et al., 2010). Um aumento dos níveis de *fshb*/Fshb tem sido observado durante a vitelogênese na maioria das espécies de teleósteos, promovendo o crescimento dos oócitos em paralelo ao aumento do IGS (LEVAVI-SIVAN et al., 2010), eventos estes também observados nas fêmeas de *A. altiparanae*. Ainda, o segundo aumento nos níveis de *fshb* observado a partir de maio de 2013 pode estar associado com a proliferação oogonial, uma vez que uma população maior de oócitos perinucleolares foi observada nesse momento.

Entretanto, nos últimos anos têm-se acumulado evidências de que o Fsh deve realizar outras funções durante o desenvolvimento ovariano (GUZMÁN et al., 2014; LUCKENBACH et al., 2013; SO et al., 2005). Tendo como base os altos níveis de *fshb*/Fshb detectados durante ou imediatamente após a ovulação, tem sido sugerido que o Fsh também atuaria nos eventos finais do ciclo reprodutivo (SO et al. 2005). Neste caso, sinalizaria para os ovários o início de um novo ciclo reprodutivo em espécies de desova total (BRETON et al., 1998; GÓMEZ et al., 1999). Também, estimularia o desenvolvimento de novos grupos de oócitos em uma mesma estação reprodutiva em espécies que apresentam

desova parcelada (AIZEN; KASUTO; LEVAVI-SIVAN, 2007; ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2014).

Ainda, um grupo de genes regulados pelo Fsh foram recentemente identificados durante a oogênese em *Onchorhynchus kisutch* (Salmoniformes), por estudos *in vitro* e *in vivo*. Tais genes estão relacionados com os eventos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, bem como na remodelação da matriz extracelular (GUZMÁN et al., 2014; LUCKENBACH et al., 2013). Estes resultados sugerem que o Fsh deve apresentar diferentes funções em estágios específicos do desenvolvimento oocitário. Também, devemos levar em consideração as possíveis consequências fisiológicas da ativação do Lhr pelo Fsh, como reportado em algumas espécies (CHAUVIGNÉ et al., 2012; SO et al., 2005), as quais permanecem não esclarecidas.

Em *A. altiparanae*, nossos dados evidenciaram um processo de vitelogênese contínuo ao longo de todo ano e sua acentuação durante a estação reprodutiva, sugerindo que nesta espécie o Fsh atuaria no recrutamento de novos grupos de oócitos para o desenvolvimento secundário, como observado em outras espécies com desova parcelada (KAJIMURA et al., 2001; SOHN et al., 1999). Em conjunto, estes achados nos chamam atenção para o fato de investigar as possíveis múltiplas funções do Fsh e as vias de sinalização por ele desencadeadas que coordenam o desenvolvimento ovariano assincrônico, como acontece em *A. altiparanae*.

Nas fêmeas de *A. altiparanae*, as mudanças observadas nos níveis de mRNAs para *fshb* não foram refletidos nas concentrações plasmáticas de E_2 , as quais estavam constantes durante todo o ciclo reprodutivo, diferindo de muitos estudos que têm associado a progressão da vitelogênese com um aumento nos níveis de E_2 (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2014; TACON et al. 2000). Níveis constantes de E_2 também foram reportados em *Hoplias malabaricus* (Characiformes), o qual apresenta desenvolvimento ovariano sincrônico em grupo e desova múltipla. Nesta espécie, os oócitos vitelogênicos foram observados somente na primavera e verão (GOMES et al., 2015), o que difere dos nossos resultados.

Os esteroides sexuais atuam sinalizando o *status* do desenvolvimento gonadal para o encéfalo e hipófise por meio de *feedback* positivo e negativo (LEVAVI-SIVAN et al., 2010). A ausência de correlação entre os níveis de transcrição de *fshb* na hipófise e dos níveis plasmáticos de E₂ observados podem ser um resultado de vários fatores, como por exemplo, pela regulação pós-transcricional, pela regulação diferenciada na secreção de Fsh e sua dinâmica no plasma, como já reportado em *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes) (CHAUVIGNÉ et al. 2016); ou até mesmo por uma expressão diferencial ou ativação de seu receptor (Fshr) no ovário. Todas essas hipóteses devem ser exploradas em trabalhos futuros.

Nas fêmeas, o Lh promove a entrada na meiose das células germinativas e a maturação final dos oócitos e ovulação, via o progestágeno 17 α ,20 β -DHP, o qual é considerado como o hormônio indutor da maturação (MIH) na maiorias das espécies de peixes (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008). Em espécies com desenvolvimento oocitário sincrônico, têm sido observados altos níveis de *lhb*/Lhb ou seu aumento progressivo durante a maturação final dos oócitos e ovulação (GOMES et al., 1999; SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003). Mas em espécies que apresentam desenvolvimento oocitário assincrônico e desova parcelada, é relatado o aumento dos transcritos para *fshb* e *lhb* em paralelo à progressão do desenvolvimento gonadal (GUZMÁN et al., 2009; MATEOS et al., 2003; WELTZIEN; NORBERG; SWANSON, 2003).

Os níveis dos mRNAs para *lhb* encontrados nas fêmeas de *A. altiparanae* foram constantes durante todo o ciclo reprodutivo, diferindo de outros estudos em espécies que apresentam desova parcelada. Ainda, os transcritos para *lhb* não aumentaram mesmo durante a estação reprodutiva, em contraste com outros estudos que têm detectado um aumento e um posterior pico dos mRNAs para *lhb*, na quantidade de Lhb presente na hipófise ou nos níveis plasmáticos de Lh durante os processos de maturação final dos oócitos, ovulação e desova, em ambiente natural (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2014; GOMEZ et al., 1999; KIM; CHO; SOHN, 2005) ou em animais em cativeiros submetidos à reprodução induzida (HONJI et al., 2015).

Desta forma, nossos dados sugerem que um distúrbio na expressão gênica de *lhb* deve ser a primeira causa do bloqueio reprodutivo que acontece nas fêmeas de *A. altiparanae* quando em cativeiro. Isso é consistente com estudo recente realizado em *Danio rerio* em que foi produzida uma linhagem *knockout* para o gene *lhb*, sendo observado que estes animais não conseguiam alcançar a maturação final dos oócitos e ovulação (CHU; GAO; HUANG, 2014). Tal estudo é considerado uma demonstração *in vivo* da necessidade da sinalização mediada pelo Lh nos eventos finais do ciclo reprodutivo.

Como esperado, considerando o perfil de transcrição de *lhb* encontrado nas fêmeas de *A. altiparanae*, também não ocorreram alterações nos níveis plasmáticos de $17\alpha,20\beta$ -DHP durante o todo o ciclo reprodutivo. Este mesmo perfil de $17\alpha,20\beta$ -DHP foi detectado em fêmeas de *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes) criadas em cativeiro (GÁRCIA-LÓPEZ et al., 2007). Todavia, neste caso, os autores sugerem que isso aconteceu porque os oócitos não foram capazes de responder a este esteroide nas condições ambientais do cativeiro.

Por outro lado, em *Salminus hilarii* (Characiformes), também não foram observadas diferenças nos níveis plasmáticos de $17\alpha,20\beta$ -DHP ao longo do ciclo reprodutivo de animais tanto no ambiente natural quanto em cativeiro, mesmo quando os transcritos para *lhb* estavam reduzidos (MOREIRA et al., 2015). Estes autores chamam atenção para o fato de que a incapacidade de ovulação desta espécie quando em cativeiro, provavelmente não é causada somente em decorrência de alterações na expressão de *lhb* ou pela modulação na produção de progestágenos pelas gonadotorpinas, mas é especulado que muitos outros distúrbios genéticos podem afetar o eixo HPG quando os animais estão cativeiro (MOREIRA et al., 2005).

Nossas análises histológicas revelaram que as fêmeas de *A. altiparanae* completaram o desenvolvimento ovariano, apresentando oócitos em crescimento secundário. Entretanto, estas fêmeas não foram capazes de naturalmente alcançar a maturação final dos oócitos, ovulação e desova, uma vez que não foram detectadas características destes processos, como oócitos em maturação final e complexos pós-

ovulatórios, caracterizando assim a ocorrência de disfunção reprodutiva nas fêmeas de *A. altiparanae* quando em cativeiro.

Nós supomos que o impedimento da migração e outras características físicas, químicas e sociais do ambiente em cativeiro não estimulam a sinalização neuroendócrina para induzir a síntese e secreção de Lh e a via sinalização por ele estimulada após a ligação com seu receptor, o que teria como resultado final a desova.

A não liberação do Lh armazenado pelas células gonadotrópicas tem sido evidenciada como a principal causa do bloqueio reprodutivo em espécies migradoras quando em cativeiro (MYLONAS et al., 2010). No entanto, nossos resultados corroboram outros estudos recentes em espécies migratórias sulamericanas (HONJI et al., 2015; MOREIRA et al., 2015), os quais têm demonstrado que as disfunções reprodutivas podem ocorrer devidos a outros problemas anteriores à síntese de gonadotropinas, bem como na complexa via de sinalização desencadeada pelas gonadotropinas nas gônadas.

Nesse contexto, ressaltamos que mais estudos envolvendo outros elementos do eixo-hipotálamo-hipófise gônadas de *A. altiparanae*, como por exemplo, os neuropeptídeos GnRH e Kisspeptina, as enzimas envolvidas na esteroidogênese gonadal e os receptores dos hormônios esteroides devem ser caracterizados, bem como os seus papéis ao longo do ciclo reprodutivo desta espécie em cativeiro.

Em relação aos receptores de gonadotropinas, a análise dos padrões de expressão gênica destes genes tem sugerido o envolvimento de ambos receptores em períodos críticos da gametogênese (LEVAVI-SIVAN et al., 2010). Nas fêmeas de *A. altiparanae*, os transcritos para *fshr* apresentaram-se aumentados desde o início do estudo (setembro de 2012) e continuaram desta forma até março de 2012, sendo observada uma redução nos meses seguintes. Os altos níveis de *fshr* coincidem com o contínuo processo de vitelogênese observado em *A. altiparanae*, bem como perduraram durante a maior parte da estação reprodutiva, provavelmente devido à ocorrência de desenvolvimento ovariano assíncrono nesta espécie. Em *Danio rerio* (Cypriniformes), os níveis de *fshr* também aumentam durante a progressão da vitelogênese, mas sofreram uma redução quando os

oócitos tornaram-se maduros, uma vez que nesta etapa os ovários são ocupados majoritariamente por oócitos aptos a entrarem no processo de maturação final (KWORK et al., 2005).

O perfil de transcrição de *fshr* em *A. altiparanae*, bem como a localização de sua proteína desde oócitos perinucleolares até vitelogênicos, corroboram o envolvimento do Fshr no recrutamento de novos grupos de oócitos e na promoção da vitelogênese em teleósteos, como já observado em *Danio rerio* (Cypriniformes) (KWORK et al., 2005), (*Dicentrearchus labrax* (Perciformes) (García-López et al. 2011) e em *Scomber japonicus* (Perciformes) (NYUJI et al., 2013).

O perfil de expressão do gene *lhr* apresentou a mesma cinética do IGS nas fêmeas de *A. altiparanae*, com um aumento progressivo a partir de setembro de 2012, um pico em janeiro de 2013 e posterior redução nos meses seguintes. Este mesmo perfil de expressão de *lhr* também tem sido observado em outros estudos (García-López et al. 2011; KWORK et al., 2005; MITTELHOLZER et al., 2009; NYUJI et al., 2013), sugerindo a necessidade do Lhr para que os oócitos possam iniciar os eventos finais da reprodução, ou seja, a maturação final, a ovulação e a desova.

O perfil de transcrição dos mRNAs para *lhr* em *A. altiparanae* somado às análises histológicas, corroboram as evidências obtidas no presente estudo de que as fêmeas no ambiente de cativeiro atingem o processo de desenvolvimento ovariano, mas não recebem os estímulos necessários para desencadear a cascata de sinalização deflagrada pelo Lh e as etapas subsequentes que culminam na desova.

Uma vez que as gonadotropinas são os principais reguladores da função testicular nos teleósteos (SCHULZ et al., 2010), neste estudo também avaliamos a expressão das subunidades das gonadotropinas em machos de *A. altiparanae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro. Nos machos de *A. altiparanae*, foi observado um aumento progressivo da expressão de *fshb* de setembro de 2012 a janeiro de 2013, período em que ocorreu um intenso processo de espermatogênese e aumento crescente dos túbulos seminíferos, com maior número de espermatozoides. Estes resultados se assemelham aos encontrados em

outras espécies de desova parcelada, como em *Odonthestes bonariensis* (Atheriniformes) (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2015), em (Pleuronectiformes), *Paralichthys olivaceus* (KAJIMURA et al., 2001), em *Dicentrarchus labrax* (Perciformes) (MATEOS et al., 2003) e em *Hippoglossus hippoglossus* (Pleuronectiformes) (WELTZEIN et al., 2003).

Paralelamente ao aumento dos níveis de *fshb*, também observamos que machos de *A. altiparanae* apresentaram níveis elevados de T e 11-kt neste mesmo período. É sabido que o Fsh é um potente indutor da esteroidogênese gonadal (Planas et al. 1993), via ativação do Fshr também expresso nas células de Leydig (SCHULZ et al., 2010). Nossos dados sugerem que a produção de andrógenos estimulada pelo Fsh também deve ocorrer em *A. altiparanae*, considerando que nesta espécie o Fshr também é expresso pelas células de Leydig. Uma vez que a produção de gonadotropinas recombinantes de *A. altiparanae* encontra-se em andamento, acreditamos que em um futuro próximo novos estudos deverão ser conduzidos para atestar e elucidar a possível função esteroidogênica do Fsh nesta espécie.

Em relação aos níveis de expressão para *lhb* em *A. altiparanae*, foi detectada uma alta expressão em setembro de 2012 e, a seguir, uma diminuição progressiva dos transcritos para este gene. Estes resultados diferem daqueles observados em espécies de desova parcelada, em que um aumento gradual dos níveis de *lhb* é observado durante o processo de gametogênese (LEVAVI-SIVAN et al., 2010). Ainda, em *Odonthestes bonariensis* (Atheriniformes) (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2015) não foram observadas alterações na expressão de *lhb* em machos durante o ciclo reprodutivo em ambiente natural.

Os estudos existentes sobre a expressão temporal dos receptores de gonadotropinas em machos, assim como nas fêmeas, também têm reportado flutuações nos níveis de ambos transcritos em diferentes fases do ciclo reprodutivo (LEVAVI-SIVAN et al. 2010). Nos testículos de *A. altiparanae*, os níveis de ambos os receptores apresentaram-se constantes durante a maior parte do ciclo reprodutivo, embora o *fshr* mostrou-se aumentado em março de 2013, ao passo que o *lhr* estava reduzido em maio 2013.

Entretanto, os resultados de nosso estudo são diferentes daqueles relatados na literatura. Para o *fshr*, tem sido observada uma flutuação moderada de sua expressão durante as fases iniciais do ciclo reprodutivo, mas seus níveis de expressão aumentam significativamente durante o processo de espermição (ELISIO; CHALDE; MIRANDA, 2015; KUSAKABE et al., 2006; MAUGARS; SCHMITZ, 2006, 2008; RAHMAN et al., 2003; ROCHA et al., 2009; SAMBRONI et al., 2007). Em *A. altiparanae* a espermatogênese é do tipo semi-cística, ou seja, as espermatídies são liberadas dos cistos, e o processo de espermiogênese é finalizado no lúmen testicular (COSTA et al., 2014). Uma vez que esse processo de espermição é contínuo ao longo de todo o ciclo reprodutivo, isso poderia estar associado aos constantes níveis de *fshr* observados durante a maior parte do ciclo reprodutivo.

Já em relação aos níveis de *lhr*, os maiores níveis de expressão deste gene têm sido correlacionados com o processo de espermição, especialmente durante a estação reprodutiva (Levavi-Sivan et. al., 2010). Em *A. altiparanae*, os níveis de *lhr* se apresentaram constantes durante a maior parte do ciclo reprodutivo, como observado em *Dicentrarchus labrax* (Perciformes) (ROCHA et al., 2009) e em *Odontheistes bonariensis* (Atheriniformes) (Elisio; Chalde; Miranda, 2015). Entretanto, estes dois estudos relataram maior expressão de *lhr* durante uma fase específica do ciclo destas espécies em que a espermição ocorre de forma predominante nos testículos, diferindo do perfil de *lhr* observado nos machos de *A. altiparanae*, possivelmente, devido ao fato de que neste Characiforme, a espermição ocorre durante a maior parte do ciclo reprodutivo.

Recentemente foi demonstrado em *Danio rerio* (Cypriniformes), *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes) e em *Sparus aurata* (Perciformes) a expressão de Lhr nas espermatídies, e que o processo de espermiogênese é dependente da ativação do Lhr pelo Lh (Chauvigné et al., 2014). Isto possivelmente explicaria os constantes níveis de *lhr* observados nos testículos de *A. altiparanae*, e sua redução em julho de 2013, período em que os testículos são ocupados majoritariamente por espermatogônias e cistos em fases iniciais da espermatogênese. Ressaltamos que, embora nossos esforços para tentar

imunolocalizar o Lhr nas células germinativas de *A. altiparanae*, os resultados foram contraditórios e mais análises devem ser realizadas.

Embora alguns trabalhos prévios envolvendo Characiformes tenham analisado os níveis plasmáticos de T e 11-kt em espécimes machos durante fases específicas do ciclo reprodutivo (GAZOLA; BORELLA, 1997) ou durante a reprodução induzida (ARANTES et al., 2003), nosso estudo em *A. altiparanae* é o primeiro relato sobre os níveis destes esteroides sexuais ao longo de diferentes fases do ciclo reprodutivo. Ambos os hormônios foram detectados ao longo de todo o ciclo e apresentaram a mesma variação sazonal, assim como observado em *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes) (CERDÁ et al., 2008; GARCÍA-LÓPEZ et al., 2006).

Entretanto, os níveis plasmáticos de 11-kt em *A. altiparanae* mostraram-se muito mais elevados que os de T, demonstrando que, também nesta espécie de Characiforme, a 11-kt é o principal andrógeno relacionado à função testicular, assim como observado na maioria dos teleósteos (GARCÍA-LÓPEZ et al., 2006; SCHULZ et al., 2010).

Numerosos estudos têm associados os efeitos do Fsh durante o início da espermatogênese a partir da estimulação da síntese de andrógenos. Da mesma forma, em nosso estudo observamos um aumento em paralelo dos níveis de transcrição de *fshb* e nos níveis plasmáticos de 11-kt, durante o período em que foi observado um intenso processo de espermatogênese em *A. altiparanae*, sugerindo que este andrógeno deve estar implicado nesse processo, como já demonstrado em outras espécies de peixes (AMER et al., 2001; CAMPBELL et al., 2003; MIURA et al., 1991; OHTA et al., 2007).

5.4 Parâmetros reprodutivos ao longo do ciclo reprodutivo em cativeiro

Entre os Characiformes, *Astyanax* é o gênero mais rico em espécies (LIMA et al., 2003), e conseqüentemente, diferentes estratégias reprodutivas têm sido observadas em suas espécies, relacionadas à extensão do ciclo reprodutivo e tipo de desova (CARVALHO et al., 2009; DALA-CORTE; AZEVEDO, 2010; VELOSO-JÚNIOR et al., 2009).

Em nosso estudo, detectamos populações de oócitos vitelogênicos e oócitos álveolo-corticais durante toda a estação reprodutiva, o que indica a ocorrência de desenvolvimento ovariano assincrônico, bem como de desova parcelada nesta espécie, similar ao observado por Chehade, Cassel e Borella (2015). Nesse estudo, esses autores também demonstraram um esvaziamento parcial das gônadas em fêmeas e machos após um episódio de reprodução induzida.

Interessantemente, embora a acentuada variação do IGS nas fêmeas, uma população de oócitos vitogênicos sempre pode ser observada durante todo o ciclo reprodutivo. Outro estudo em andamento por nosso grupo de pesquisa realizou uma análise quantitativa dos tipos celulares germinativos durante o ciclo reprodutivo em cativeiro, evidenciando populações constantes de oócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos, embora estes últimos fossem mais abundantes durante a estação reprodutiva, subsidiando os resultados qualitativos encontrados no nosso trabalho.

Estas características sugerem que *A. altiparanae* poderia realizar desovas fora do período reprodutivo, provendo desta forma um suprimento constante de ovos para aplicações na aquicultura bem como para sua utilização como modelo animal em laboratório. Ainda, Chehade et al., (2015) demonstraram que as fêmeas e machos de *A. altiparanae* podem alcançar a desova em cativeiro pela modulação do nível de água do tanque, sem a utilização de indução por hormônios exógenos. Desta forma, estudos adicionais devem ser desenvolvidos nessa área para atestar estas potenciais características zootécnicas de *A. altiparanae*.

Nosso estudo demonstrou que os machos de *A. altiparanae* também completam o processo espermatogênico quando mantidos em cativeiro, mas que provavelmente, não são capazes de alcançar naturalmente as etapas de maturação final dos espermatozoides e liberação dos mesmos. Este fato é justificado porque não foram encontrados animais com testículos com características semelhantes aos que foram submetidos ao processo de desova relatados nesta espécie por Chehade, Cassel e Borella (2015), como uma grande área ocupada por sêmen e espermatozoides, e esvaziamento dos túbulos seminíferos.

Entretanto, ressaltamos que até o momento, não foram desenvolvidos estudos que avaliassem a qualidade do sêmen destes animais em cativeiro, o que poderia, talvez, evidenciar o comprometimento de outras características seminais resultantes do ambiente em cativeiro, as quais podem interferir de modo negativo na reprodução induzida de *A. altiparanae*, como já relatado em outra espécie de Characiformes (DE SOUZA et al., 2015).

6 CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho, concluimos que:

- A clonagem molecular das subunidades das gonadotropinas e dos receptores de gonadotropinas em *A. altiparanae* permitiu a aplicação de novas ferramentas moleculares no estudo da fisiologia reprodutiva desta espécie.
- O Fshb de *A. altiparanae* apresenta uma sequência menos conservada em relação às subunidades Gpha e Lhb.
- A análise filogenética revelou que tanto as subunidades das gonadotropinas quanto seus receptores apresentam maior identidade de aminoácidos com sequências homólogas das Ordens Siluriformes e Cypriniformes.
- Não foi detectada expressão extra-hipofisial de gonadotropinas, bem como a expressão extragonadal dos receptores de gonadotropinas.
- Na hipófise, a expressão de Fshb e Lhb ocorre em distintas populações de células gonadotrópicas.
- Ambos receptores de gonadotropinas (Fshr e Lhr) são expressos nas células de Sertoli e Leydig, e nas células foliculares e da teca a partir de oócitos perinucleolares.
- O *fshb* provavelmente estimula o contínuo processo de vitelogênese durante todo o ciclo reprodutivo e o desenvolvimento de novos grupos de ócitos para o processo de desova parcelada nas fêmeas, bem como o contínuo processo de espermatogênese e a espermiacção nos machos.
- A disfunção reprodutiva observada nas fêmeas, quando em cativeiro, provavelmente está relacionada com a síntese de Lh.
- Nos ovários, a expressão de *fshr* deve estar relacionada no recrutamento e crescimento dos oócitos, ao passo que a de *lhr* deve estar envolvida com a maturação final dos oócitos.
- Nos testículos, os níveis constantes de *fshr* devem estar associados ao contínuo processo de gametogênese, ao passo que o *lhr* pode estar associado com a espermiogênese.
- A 11-kt deve ser o principal andrógeno na regulação da fisiologia reprodutiva dos machos de *A. altiparanae*.

REFERÊNCIAS*

ADOLFI, M. C.; CARREIRA, A. C. O.; JESUS, L. W. O.; BOGERD, J.; FUNES, R. M.; SCHARTL, M.; SOGAYAR, M. C.; BORELLA, M. I. 2015. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, p. 2, 2015.

AGULLEIRO, B.; GARCÍA-HERNANDEZ, M. P.; GARCÍA-AYALA, A. Teleost adenohypophysis: morphofunctional and development aspects. In: REINECKE, M.P.; ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G. (Eds) **Fish Endocrinology**. Enfield: Science Publishers, 2006. v. 1, p. 289-440.

AIZEN, J.; KASUTO, H.; LEVAVI-SIVAN, B. Development of specific enzyme-linked immunosorbent assay for determining LH and FSH levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. **General and Comparative Endocrinology**, v. 153, p. 323-332, 2007.

AIZEN, J.; KOWALSMAN, N.; KOBAYASHI, M.; HOLLANDER, L.; SOHN, Y. C.; YOSHIZAKI, G.; NIV, M. Y.; LEVAVI-SIVAN, B. Experimental and computational study of inter- and intra- species specificity of gonadotropins for various gonadotropin receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 364, p. 89-100, 2012.

ALMEIDA, F. A. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p.174-180, 2013.

AMANO, M.; OKA, Y.; AIDA, K.; OKUMOTO, N.; KAWASHIMA, S.; HASEGAWA, Y. Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 314, p. 587-597, 1991.

AMER, M. A.; MIURA, T.; MIURA, C.; YAMAUCHI, K. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1057-1066, 2001.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANDERSSON, A.; NIJENHUIS, W.; MALE, R.; SWANSON, P.; BOGERD, J.; TARANGER, G. L.; SCHULZ, R. W. Pharmacological characterization, localization and quantification of expression of gonadotropin receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ovaries. **General and Comparative Endocrinology**, v. 163, p. 329-339, 2009.

ARANTES, F. P.; SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimatã-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 172, p. 400-408, 2011.

BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOEHI, V. M.; QUEVEDO, R. M.; ITTSES, II.; KRIEGER, M. H.; LULHIER, F. Steroid profile in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Qoy and Gairmars, Pisces, Teleostei), during the first reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, p. 325-332, 2001.

BASUA, D.; BHATTACHARYAB, S. Purification of two types of gonadotropin receptors from carp ovarian follicles: overlapping recognition by two different ligands. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, p. 152-162, 2002.

BENTLEY, P. J. **Comparative vertebrate endocrinology**. United Kingdom: Cambridge, 1998. 3. ed. 236 p.

BIRBA, A.; RAMALLO, M. R.; LO NOSTRO, F.; GUIMARÃES, R. M.; PANDOLFI, M. Reproductive and parental care physiology of *Cichlasoma dimerus* males. **General and Comparative Endocrinology**, v. 221, p. 193-200, 2015.

BOGERD, J.; BLOMENROHR, M.; ANDERSSON, E.; VAN DER PUTTEN, H. H.; TENSEN, C. P.; VISCHER, H. F.; GRANNEMAN, J. C.; JANSSEN-DOMMERHOLT, C.; GOOS, H. J.; SCHULZ, R. W. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). **Biology of Reproduction**, v.64, p. 1633-1643, 2001.

BOGERD, J.; GRANNEMAN J, C.; SCHUZ, R. W.; VISCHER, H. F. Fish FSH receptors bind LH: how to make the human FSH receptor to be more fishy? **General and Comparative Endocrinology**, 142, p. 34-43, 2005.

BORELLA, M. I.; GAZOLA, R.; VAL-SELLA, M. V.; FAVA-DE-MORAES, F. Histochemical and immunohistochemical study of the pituitary gland of the South-American teleost pacu

fish *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.14, p. 219-225, 1997.

BORELLA, M. I.; VENTURIERI, R.; MANCERA, J. M. Immunocytochemical identification of adenohypophyseal cells in the pirarucu (*Arapaima gigas*), an Amazonian basal teleost. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 35, p. 3-16, 2009.

BRANCO, G. S. **Caracterização da diferenciação celular durante a morfogênese da hipófise em *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)**. 2015. 71 f.Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

BRETON, B.; GOVOROUN, M.; MIKOLAJCZYK, T. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 111, p. 38-50, 1998.

BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, v. 3, p. 52-70, 2011.

CAMARGO, M. P. **Caracterização das espermatogônias indiferenciadas e dos nichos espermatogoniais em *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000** (Teleostei, Characidae). 2015. 57 f.Dissertação (Mestrado em Biologia Celualr e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CAMPBELL, B.; DICKEY, J. T.; SWANSON, P. Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 2109-2117, 2003.

CARVALHO, P. A.; PASCHOALINI, A. L.; SANTOS, G. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. **Jounal of Applied Ichthyology**, v. 25, p. 306-313, 2009.

CARVALHO, R. F. **Clonagem, caracterização e análise filogenética das subunidades alfa e beta do hormônio folículo estimulante de pirarucu (*Arapaima gigas*)**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2014.

CERDÀ, J.; CHAUVIGNE, F.; AGULLEIRO, M. J.; MARIN, H.; HALM, S.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; PRAT, F. Molecular cloning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits and expression pattern during spermatogenesis. **General and Comparative Endocrinology**, v.156, p. 470-481, 2008.

CHABBI, A.; GANESH, C. B. Stress-induced inhibition of recruitment of ovarian follicles for vitellogenic growth and interruption of spawning cycle in the fish *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 38, p. 1521-1532, 2012.

CHANG, Y. S.; HUANG, C. J.; HUANG, F. L.; LO, T. B. Primary structures of carp gonadotropin subunits deduced from cDNA nucleotide sequences. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 32, p. 556-564, 1988.

CHAUVIGNÉ, F.; FATSINI, E.; DUNCAN, N.; OLLÉ, J.; ZANUY, S.; GÓMEZ, A.; CERDÀ, J. Plasma levels of follicle-stimulating and luteinizing hormones during the reproductive cycle of wild and cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*), **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 191, p. 35-43, 2016.

CHAUVIGNÉ, F.; VERDURA, S.; MAZON, M. J.; DUNCAN, N.; ZANUY, S.; GOMEZ, A.; CERDÀ, J. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone mediate the androgenic pathway in Leydig cells of an evolutionary advanced teleost. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 35, p. 1-11, 2012.

CHAUVIGNÉ, F.; ZAPATERA, C.; GASOLB, J. M.; CERDÀ, J. Germ-line activation of the luteinizing hormone receptor directly drives spermiogenesis in a nonmammalian vertebrate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 111, n. 4, p. 1427-1432, 2014.

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

CHU, C.; GAO, G.; HUANG, W. A study on co-localization of FSH and its receptor in rat hippocampus. **Journal of Molecular Histology**, v. 39, p. 49-55, 2008.

CHU, L.; LI, J.; LIU, Y.; HU, W.; CHENG, C. H. K. Targeted gene disruption in zebrafish reveals noncanonical functions of Lh signaling in reproduction. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 11, p. 1785-1795, 2014.

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

DALA-CORTE, R. B.; AZEVEDO, M. A. 2010. Biologia reprodutiva de *Astyanax henseli* (Teleostei, Characidae) do curso superior do rio dos Sinos, RS, Brasil. **Iheringia - Série Zoológica**, v. 100, p. 259-266.

DE SOUZA, T. G.; HAINFELLNER, P.; KURADOMI, R. Y.; MUÑOZ, M. E.; HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G.; BATLOUNI, S. R. Inappropriate management conditions, especially for the regressed class, are related to sperm quality in *Prochilodus lineatus*. **Theriogenology**, v. 83, p. 797-807, 2015.

DEGANI, G.; GOLDBERG, D.; TZCHORI, I.; HURVITZ, A.; DIN, S. Y.; JACKSON, K. 2003. Cloning of European eel (*Anguilla anguilla*) FSHb subunit, and expression of FSHb and LHb males and females after sex determination. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, p. 283-293, 2003.

DIMMICK, W. W.; LARSON, A. A molecular and morphological perspective on the phylogenetic relationships of the otophysan fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 6, p. 120-133, 1996.

ELISIO, M.; CHALDE, T.; MIRANDA, L. A. Seasonal changes and endocrine regulation of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) oogenesis in the wild. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 175, p. 102-109, 2014.

ELISIO, M.; CHALDE, T.; MIRANDA, L. A. Seasonal changes and endocrine regulation of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) spermatogenesis in the wild. **General and Comparative Endocrinology**, v. 221, p. 236-243, 2015.

ELISIO, M.; SORIA, F. N.; FERNANDINO, J. I.; STRÜSSMANN, C. A.; SOMOZA, G. M.; MIRANDA, L. A. Extrahypophyseal expression of gonadotropin subunits in pejerrey *Odontesthes bonariensis* and effects of high water temperatures on their expression. **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, p. 329-336, 2012.

FARIA, M. T.; CARVALHO, R. F.; SEVILHANO, T. C.; OLIVEIRA, N. A.; SILVA, C. F.; OLIVEIRA, J. E.; SOARES, C. R.; GARCEZ, R.; SANTO, P. R.; BARTOLINI, P. 2013. Isolation of the pituitary gonadotrophic α -subunit hormone of the giant amazonian fish: pirarucu (*Arapaima gigas*). **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 39, p. 683-693, 2013.

FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, E. S.; LÓPEZ, P. A.; FREITAS, R. T. F.; FERREIRA, M. R. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Theriogenology**, v. 77, p. 1570-1574, 2012.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, M. P.; GARCÍA-AYALA, A.; ZANDBERGEN, M. A.; AGULLEIRO, B. Investigation into the duality of gonadotropic cells of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810): immunocytochemical and ultrastructural studies. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, p. 25-35, 2002.

GARCÍA-LÓPEZ, A.; BOGERD, J.; GRANNEMAN, J. C.; VAN DIJK, W.; TRANT, J. M.; TARANGER, G. L.; SCHULZ, R. W. Leydig cells express FSH receptors in African catfish. **Endocrinology**, v. 150, p. 357-365, 2009.

GARCÍA-LÓPEZ, A.; COUTO, E.; CANARIO, A. V. M.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, G. Ovarian development and plasma sex steroid levels in cultured female Senegalese sole *Solea senegalensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, p. 342-354, 2007.

GARCÍA-LÓPEZ, A.; DE JONGE, H.; NÓBREGA, R. H.; DE WAAL, P. P.; VAN DIJK, W.; HEMRIKA, H.; TARANGER, G. L.; BOGERD, J.; SCHULZ, R. W. Studies in Zebrafish Reveal Unusual Cellular Expression Patterns of Gonadotropin Receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. **Endocrinology**, v. 151, p. 2349-2360, 2010.

GARCÍA-LÓPEZ, A.; FERNÁNDEZ-PASQUIER, V.; COUTO, E.; CANARIO, A. V.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, p. 343-351, 2006.

GARCÍA-LÓPEZ, A.; SÁNCHEZ-AMAYA, M. I.; PRAT, F. Targeted gene expression profiling in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) follicles from primary growth to late vitellogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 160, p. 374-380, 2011.

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

GAZOLA, R.; BORELLA, M. I. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 30, p. 1485-1487, 1997.

GAZOLA, R.; BORELLA, M. I.; DONALDSON, E. M.; VAL-SELLA, M. V.; SUKUMASAVIN, N.; FAVA-DE-MORAES, F.; BERNARDINO, G. Plasma steroid and corticosteroid levels in female pacu *Piaractus mesopotamicus*, Teleostei-Characidae. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 29, p. 659-664, 1996.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 351-360, 2007.

GOLAN, M.; BIRAN, J.; LEVAVI-SIVAN, B. A novel model for development, organization, and function of gonadotropes in fish pituitary. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. 182, p.1-11, 2014.

GOLAN, M.; LEVAVI-SIVAN, B. Social dominance in tilapia is associated with gonadotroph hyperplasia. **General and Comparative Endocrinology**, v.192, p. 126-135, 2013.

GOMES, A. D.; TOLUSSI, C. E.; RIBEIRO, C. D.; HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G. The role of ovarian steroids in reproductive plasticity in *Hoplias malabaricus* (Teleostei: Characiformes: Erythrinidae) in tropical reservoirs with different degrees of pollution. **General and Comparative Endocrinology**, v. 222, p. 1-10, 2015.

GOMES, C. C. **Caracterização molecular dos GnRHs de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000), seu efeito in vivo, e sua expressão temporal ao longo do estímulo reprodutivo**. 2015. 143 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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

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

GRANDI, G.; MARCHETTI, M. G.; LANZONI, M.; CHICCA, M. Immunocytochemical and ultrastructural identification of adenohypophyseal cells in *Ctenopharyngodon idella* (Cypriniformes: Cyprinidae) during gonadal differentiation. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 40, p. 1115-1139, 2014.

GRIER H. J.; ARANZÁBAL, M. C. U. The testis and spermatogenesis in teleosts. In: JAMIESON, B. G. G. (Ed.). **Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)**, Enfield: Science Publications, 2009, p. 121-142

GRIER, H. J. Development of the follicle complex and oocyte staging in red drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). **Journal of Morphology**, v. 273, p. 801-829, 2012.

GRIER, H. J.; ARANZÁBAL MC.U., PATINO R. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. In: JAMIESON, B. G. G. (Ed.). **Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)**, Enfield: Science Publications, 2009, p. 25-84.

GUILGUR, L. G.; STRUSSMANN, C. A.; SOMOZA, G. M. mRNA expression of GnRH variants and receptors in the brain, pituitary and ovaries of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in relation to the reproductive Status. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 35, p. 157-166, 2009.

GUZMÁN, J. M.; LUCKENBACH, A.; YAMAMOTO, Y.; SWANSON, P. Expression profiles of Fsh-regulated ovarian genes during oogenesis in coho salmon. **PLoS ONE**, v. 9, n.12, 2014.

GUZMÁN, J. M.; LUCKENBACH, J. A.; SWANSON, P. Molecular characterization and quantification of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) gonadotropins and their receptors: Reproductive dysfunction in female captive broodstock. **General and Comparative Endocrinology**, v. 193, p. 37-47, 2013.

GUZMÁN, J. M.; RUBIO, M.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; KLENKE, U.; KIGHT, K.; CROSS, I., SÁNCHEZ-RAMOS, I.; RIAZA, A.; REBORDINOS, L.; SARASQUETE, C.; ZOHAR, Y.; MAÑANÓS, E. L. Comparative gene expression of gonadotropins (FSH and LH) and peptide levels of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in the pituitary of wild and cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstocks. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.153, p. 266-277, 2009.

HAINFELLNER, P. **Ciclo reprodutivo e indução hormonal de fêmeas de mapará (*Hypophthalmus marginatus*) no baixo Rito Tocantis, à jusante da bafragem de**

Tucuruí. 2015. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2015.

HAINFELLNER, P.; DE SOUZA, T. G.; MOREIRA, R. G.; NAKAGHI, L. S. O.; BATLOUNI, S. R. Gonadal steroids levels and vitellogenesis in the formation of oocytes in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 601-612, 2012a.

HAINFELLNER, P.; DE SOUZA, T. G.; MUÑOZ, M. E.; FREITAS, G. A.; BATLOUNI, S. R. Spawning failure in *Brycon amazonicus* may be associated with ovulation and not with final oocyte maturation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p.515-517, 2012b.

HEARN, M. T.; GOMME, P. T. Molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily: part I. The glycoprotein hormones. **Journal of Molecular Recognition**, v. 13, p. 223-278, 2000.

HOLLAND, M. C.; HASSIN, S.; ZOHAR, Y. Seasonal fluctuations in pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei), during juvenile and pubertal development. **Journal of Endocrinology**, v. 169, p. 527-538, 2001.

HONJI, R. M.; CANEPPELE, D.; PANDOLFI, M.; LO NOSTRO, F. L.; MOREIRA, R. G. Gonadotropins and growth hormone family characterization in an endangered siluriform species, *Steindachneridion parahybae* (Pimelodidae): relationship with annual reproductive cycle and induced spawning in captivity. **Anatomical Records**, v. 298, p. 1644-1658, 2015.

HONJI, R. M.; NARCIZO, A. M.; BORELLA, M. I.; ROMAGOSA, E.; MOREIRA, R. G. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 35, p. 109-123, 2009.

HONJI, R. M.; NÓBREGA, R. H.; PANDOLFI, M.; SHIMIZU, A.; BORELLA, M.I.; MOREIRA, R. G. Immunohistochemical study of pituitary cells in wild and captive *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) females during the annual reproductive cycle. **SpringerPlus**, v. 2, p. 460-474, 2013.

HUANG, H.; ZHANG, Y.; HUANG, W. R.; LI, S. S.; ZHU, P.; LIU, Y.; YIN, S. W.; LIU, X. C.; LIN, H. R. Molecular characterization of marbled eel (*Anguilla marmorata*) gonadotropin

subunits and their mRNA expression profiles during artificially induced gonadal development. **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, p. 192-202, 2009.

JALABERT, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. **Reproduction Nutrition Development**, n.45, p. 261-279, 2005.

JESUS, L. W. O.; CHEHADE, C.; COSTA, F. G.; BORELLA, M. I. Pituitary gland morphogenesis and ontogeny of adenohypophyseal cells of *Salminus brasiliensis* (Teleostei, Characiformes). **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 40, p. 897-909, 2014.

KAGAWA, H.; KAWAZOE, I.; TANAKA, H.; OKUZAWA, K. Immunocytochemical identification of two distinct Gonadotropic cells (GTI and GTHII) in the pituitary of Bluefin Tuna, *Thunnus thynnus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 110, p. 11-18, 1998.

KAJIMURA, S.; YOSHIURA, Y.; SUZUKI, M.; AIDA, K. cDNA cloning of two gonadotropin b subunits (GTH-Ib and -IIb) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, p. 117-129, 2001.

KASPER, R. S.; SHVED, N.; TAKAHASHI, A.; REINECKE, M.; EPPLER, E. A systematic immunohistochemical survey of the distribution patterns of GH, prolactin, somatolactin, beta-TSH, beta-FSH, beta-LH, ACTH, and alpha-MSH in the adenohypophysis of *Oreochromis niloticus*, the Nile tilapia. **Cell and Tissue Research**, v. 325, p. 303-313, 2006.

KAWAUCHI, H.; SOWER, S. A. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. **General and Comparative Endocrinology**, v.148, p. 3-14, 2006.

KAZETO, Y.; KOHARA, M.; TOSAKA, R.; GEN, K.; YOKOYAMA, M.; MIURA, C.; MIURA, T. ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. Molecular Characterization and Gene Expression of Japanese Eel (*Anguilla japonica*) Gonadotropin Receptors. **Zoological Science**, v. 29, p. 204-211, 2012.

KIM, D-J.; CHO, Y. C.; SOHN, Y. C. Molecular characterization of rockfish (*Sebastes schlegelii*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 141, n.282-290, 2005.

KOBAYASHI, T.; ANDERSEN, Ø. The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), 1: Isolation of multiple transcripts encoding full-length and truncated variants of FSH-R. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, p. 584-594, 2008.

KOBAYASHI, T.; PAKARINEN, P.; TORGERSEN, J.; HUHTANIEMI, I.; ANDERSEN, Ø. The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) -2. Differential follicle expression and asynchronous oogenesis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, p. 595-602, 2008.

KUMAR, R. S.; IJIRI, S.; TRANT, J. M. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 1. Cloning of a functional luteinizing hormone receptor and pre-ovulatory induction of gene expression. **Biology of Reproduction**, v. 64, p.1010-1018, 2001.

KUMAR, R. S.; TRANT, J. M. Piscine glycoprotein hormone (gonadotropin and thyrotropin) receptors: a review of recent developments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, p.347-355, 2001.

KURADOMI, R. Y.; DE SOUZA, T. G.; FORESTI, F.; SCHULZ, R. W.; BOGERD, J.; MOREIRA, R. G.; FURLAN, L. R.; ALMEIDA, E. A.; MASCHIO, L. R.; BATLOUNI, S. R. Effects of re-stripping on the seminal characteristics of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the breeding season. **General and Comparative Endocrinology**, v. 225, p. 162-173, 2016.

KUSAKABE, M.; NAKAMURA, I.; EVANS, J.; SWANSON, P.; YOUNG, G. Changes in mRNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 541-554, 2006.

KWOK, H. F.; SO, W. K.; WANG, Y.; GE, WEI. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors - evidence for their distinct functions in follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 1370-1381, 2005.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LE MENN, F.; CERDÀ, J.; BABIN, P. J. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Eds.). **The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications**. Dordrecht: Springer, 2007, p. 1-37.

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

LI, C. J.; ZHOU, L.; WANG, Y.; HONG, Y. H.; GUI, J. F. Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common α , FSH β and LH β in groupers. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 233, p. 33-46, 2005.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSALTI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. 2003. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (eds): **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, 2003. p. 106-169.

LITICHEVER, N.; GERSHON, E.; DEKEL, N.; KOCH, Y. Hormonal regulation of GnRH and LH β mRNA expression in cultured rat granulosa cells. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 39, p. 78-85, 2009.

LIU, Z.; KIM, S.; KARSI, A. Channel catfish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: complementary DNA cloning and expression during ovulation. **Marine Biotechnology**. v. 3, p. 590-599, 2001.

LOWERRE-BARBIERI, S. K.; BROWN-PETERSON, N. J.; MURUA, H.; TOMKIEWICZ, J. W.; DAVID, M.; SABORIDO-REY, F. Emerging issues and methodological advances in fisheries reproductive biology. **Marine and Coastal Fisheries**, v. 3, p. 32-35, 2011.

LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÀ, J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 367-389, 2010.

LUCKENBACH, J. A.; YAMAMOTO, Y.; GUZMÁN, J. M.; SWANSON, P. Identification of ovarian genes regulated by follicle-stimulating hormone (Fsh) *in vitro* during early secondary oocyte growth in coho salmon. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 366, p. 38-52, 2013.

MAGLIULO-CEPRIANO, L.; SCHREIBMAN, M. P.; BLUM, V. Distribution of variant forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone and beta-gonadotropins I and II in the

platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity. **General and Comparative Endocrinology**, v. 94, p. 135-150, 1994.

MARKKULA, M.; HAMALAINEN, T.; LOUNE, E.; HUHTANIEMI, I. The follicle stimulating The follicle-stimulating hormone (FSH) beta- and common alpha-subunits are expressed in mouse testis, as determined in wild-type mice and those transgenic for the FSH beta-subunit/herpes simplex virus thymidine kinase fusion gene. **Endocrinology**, v. 136, p. 4769-4775, 1995.

MATEOS, J.; MAÑANÓS, E.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; CARRILLO, M.; QUERAT, B.; ZANUY, S. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (alpha, FSHbeta, and LHbeta) and their expression during the reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 133, p. 216-232, 2003.

MAUGARS, G., SCHMITZ, M. Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **General and Comparative Endocrinology**, v. 149, p. 108–117, 2006.

MAUGARS, G.; SCHMITZ, M. Gene expression profiling during spermatogenesis in early maturing male Atlantic salmon parr testes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 159, p. 178-187, 2008.

McMILLAN, D.N. **Fish Histology: Female reproductive systems**. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2007, 598 p.

MIRANDA, L. A.; STRUSSMANN, C. A.; SOMOZA, G. M. Immunocytochemical identification of GtH1 and GtH2 cells during the temperature-sensitive period for sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 124, p. 45-52, 2001.

MITTELHOLZER, C.; ANDERSSON, E.; TARANGER, G. L., CONSTEN, D. HIRAI, T. SENTHILKUMARAN, B.; NAGAHAMA, Y.; NORBERG, B. Molecular characterization and quantification of the gonadotropin receptors FSH-R and LH-R from Atlantic cod (*Gadus morhua*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, p. 47-58, 2009.

MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Biomedical Research**, v. 12, p. 241-248, 1991.

MOREIRA, R. G.; HONJI, R. M.; MELO, R. G.; NARCIZO, A. DE M.; AMARAL, J. S.; ARAÚJO, R. DE C.; HILDSORF, A. W. The involvement of gonadotropins and gonadal steroids in the ovulatory dysfunction of the potamodromous *Salminus hilarii* (Teleostei: Characidae) in captivity. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 41, p. 1435-1447, 2015.

MU, W. J.; WEN, H. S.; HE, F.; LI, J. F.; LIU, L.; ZHANG, Y. Q.; HU, J.; QI, B. X. Cloning and expression analysis of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor during the reproductive cycle in Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, p.287-298, 2013.

MUKAI, T.; OOTA, Y. 1995. Histological changes in the pituitary, thyroid gland and gonads of the fourspine sculpin (*Cottus kazika*) during downstream migration. **Zoological Sciences**, v.12, p. 91-97.

MYLONAS, C. C.; ZOHAR, Y. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. **Aquaculture**, v. 202, p. 205–220, 2001.

MYLONAS, C.C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 516-534, 2010.

NAGAHAMA, Y.; PETER, R. E. Effects of brain lesions of gonadotrop ultrastructure and serum gonadotropin levels in goldfish. **Cell and Tissue Research**, v. 225, p. 259-265, 1982.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, Growth & Differentiation**, v. 50, p. 195-219, 2008.

NAITO, N.; HYODO, S.; OKUMOTO, N.; URANO, A.; NAKAI, Y. 1991. Differential production and regulation of gonadotropins (GTH I and GTH II) in the pituitary gland of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. **Cell and Tissue Research**, v. 266, p. 457-467, 1991.

NAITO, N.; SUZUKI, K.; NOZAKI, M.; SWANSON, P.; KAWAUCHI, H. NAKAI, Y. Ultrastructural characteristics of two distinct gonadotropes (GTH I- and GTH II-cells) in the pituitary of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 11, p. 241-246, 1993.

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

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4 edition. New York: John Wiley & Sons Inc. 2006. 601 p.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L.R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 35, p. 197-206, 2009.

NOZAKI, M.; NAITO, N.; SWANSON, P.; DICKHOFF, W. W.; NAKAI, Y.; SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *General and Comparative Endocrinology*, v. 77, p. 358-367, 1990.

NYUJI, M.; KITANO, H.; SHIMIZU, A.; LEE, J. M.; KUSAKABE, T.; YAMAGUCHI, A.; MATSUYAMA, M. Characterization, localization, and stage-dependent gene expression of gonadotropin receptors in chub mackerel (*Scomber japonicus*) ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 1-14, 2013.

OBA, Y.; HIRAI, T.; YOSHIURA, Y.; YOSHIKUNI, M.; KAWAUCHI, H.; NAGAHAMA, Y. Cloning, functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.263, p. 584-590, 1999.

OBA, Y.; HIRAI, T.; YOSHIURA, Y.; YOSHIKUNI, M.; KAWAUCHI, H.; NAGAHAMA, Y. The Duality of Fish Gonadotropin Receptors: Cloning and Functional Characterization of a Second Gonadotropin Receptor cDNA Expressed in the Ovary and Testis of Amago Salmon (*Oncorhynchus hodurus*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, p. 366-371, 1999.

OHKUBO, M.; YABU, T.; YAMASHITA, M.; SHIMIZU, A. Molecular cloning of two gonadotropin receptors in mummichog *Fundulus heteroclitus* and their gene expression during follicular development and maturation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 184, p. 75-86, 2013.

OHTA, T.; MIYAKE, H.; MIURA, C.; KAMEI, H.; AIDA, K.; MIURA, T. Follicle stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Biology of Reproduction**, v.77, p. 970-977, 2007.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T.; MARINGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTI, G.; VARI, R. P.; CORRÊA E CASTRO, R. M. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) bases on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 275, 2001.

PANDOLFI, M.; LO NOSTRO, F. L.; SHIMIZU, A.; POZZI, A. G.; MEIJIDE, F. J.; VAZQUEZ, G. R.; MAGGESE, M. C. Identification of immunoreactive FSH and LH cells in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* during the ontogeny and sexual differentiation. **Anatomy and Embryology**, v. 211, p. 355-365, 2006.

PANDOLFI, M.; POZZI, A. G.; CÂNEPA, M.; VISSIO, P. G.; SHIMIZU, A.; MAGESE, M. C.; LOBO, G. Presence of β -Follicle-stimulating hormone and β -Luteinizing hormone transcripts in the brain of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes: Cichlidae). **Neuroendocrinology**, v. 89, p. 27-37, 2009.

PARHAR, I.; SOGA, T.; OGAWA, S.; SAKUMA, Y. FSH and LH- β subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. **General and Comparative Endocrinology**, v. 132, p. 369-378, 2003.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011.

PIERCE, J. G.; PARSONS, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, p. 465-495, 1981.

PLANAS, J. V.; ATHOS, J.; GOETZ, F. W.; SWANSON, P. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1262-1269, 2000.

PLANAS, J. V.; SWANSON, P.; DICKHOFF, W. W. Regulation of testicular steroid production in vitro by gonadotropins (GTH I and GTH II) and cyclic AMP in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 91, 8-24, 1993.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 105-120.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; CASTILHO-ALAMEIDA, R. B. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura**, v.11, n. 67, p. 15-19, 2001.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. **Microscopic Research and Technique**, v. 32, p. 459-497, 1995.

QUERAT, B.; SELLOUK, A.; SALMON, C. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.222-228, 2000.

QUERAT, B.; TONNERRE-DONCARLI, C.; GENIES, F.; SALMON, C. 2001. Duality of gonadotropins in gnathostomes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 124, p. 308-314, 2001.

RAHMAN, M. A.; OHTA, K.; YAMAGUCHI, A.; CHUDA, H.; HIRAI, T.; MATSUYAMA, M. Gonadotropins, gonadotropin receptors and their expressions during sexual maturation in yellowtail, a carangid fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 81-83, 2003.

ROCHA, A.; GOMEZ, A.; ZANUY, S.; CERDA-REVERTER, J. M.; CARRILLO, M. 2007. Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 272, p. 63-76, 2007.

ROCHA, A; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; GOMEZ, A. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, p 265-275, 2009.

SAMBRONI, E.; LE GAC, F.; BRETON, B.; LAREYRE, J. J. Functional specificity of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line. **Journal of Endocrinology**, v. 195, p. 213-228, 2007.

SCHULZ, R. W, DE FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LE GAC, F., CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, 390-411, 2010.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 26, p. 43-56, 2002.

SCHULZ, R. W.; VISCHER, H. F.; CAVACO, J. E.; SANTOS, E. M.; TYLER, C. R.; GOOS, H. J. TH, BOGERD, J. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, p. 407-417, 2001.

SEVILHANO, T. C. A. **Clonagem, caracterização e análise filogenética das subunidades alfa e beta do hormônio luteinizante de pirarucu (*Arapaima gigas*)**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2015.

SHIMIZU, A.; KAGAWA, H.; TANAKA, H. Immunocytochemical identification of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in various perciform fishes using antisera raised against synthetic peptides. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 109-110, 2003a.

SHIMIZU, A.; SAKAI, T.; NASHIDA, K.; HONDA, H. Universal antisera for immunocytochemical identification of two different gonadotrophs in acanthopterygian fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 29, 275-287, 2003b.

SHIMIZU, A.; TANAKA, H.; KAGAWA, H. Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygians fishes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 132, p. 35-45, 2003c.

SHINODA, T.; MIRANDA, L. A.; OKUMA, K.; HATTORI, R. S.; FERNANDINO, J. I.; YOSHIKAZI, G.; SOMOZA, G. M.; STRÜSSMANN, C. A. Molecular cloning and expression analysis of Fshr and Lhr in relation to Fshb and Lhb subunits during the period of temperature-dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Molecular Reproduction & Development**, v.77, p. 521-532, 2010.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SILVA, A. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yelowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1033-1042, 2015.

SO, W. K.; KWOK, H. F.; GE, W. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits-their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. **Biology of Reproduction**, v.72, p. 1382-1396, 2005.

SOHN, Y. C.; YOSHIURA, Y.; KOBAYASHI, M.; AIDA, K. Seasonal changes in mRNA levels of gonadotropin and thyrotropin subunits in the goldfish, *Carassius auratus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, p. 436-444, 1999.

SWANSON, P.; DICKEY, J. T.; CAMPBELL, B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 28, p. 53-59, 2003.

TACON, P.; BAROILLER, J. F.; LE BAIL, P. Y.; PRUNET, P.; JALABERT, B. 2000. Effect of egg deprivation on sex steroids, gonadotropin, prolactin, and growth hormone profiles during the reproductive cycle of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 117, 54-65, 2000.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FFILIPSKI, A.; KUMAS, S. Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TYLER, C. R.; POTTINGER, T. G.; COWARD, K.; PRAT, F.; BERESFORD, N.; MADDIX, S. Salmonid follicle-stimulating hormone (GtH I) mediates vitellogenic development of oocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1238-1244, 1997.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da Reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringa, EDUEM, 1996. 169 p.

VELOSO-JÚNIOR, V. C.; GUIMARÃES-CRUZ, R. J.; BARROS, M. D. M.; BARATA, R. S. L.; SANTOS, J. E. Reproduction of the lambari *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces: Characidae) in a small stream in Southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, p. 314-320, 2009.

VISCHER, H. F.; BOGERD, J. Cloning and functional characterization of a gonadal luteinizing hormone receptor complementary dna from the african catfish (*Clarias gariepinus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 262-271, 2003.

VISCHER, H. F.; TEVES, A. C. C.; ACKERMANS, J. C. M.; VAN DIJK, W.; SCHULZ, R. W.; BOGERD, J. Cloning and spatiotemporal expression of the follicle-stimulating hormone β subunit complementary DNA in the African catfish (*Clarias gariepinus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1324-1332, 2003.

VISSIO, P. G.; SOMOZA, G.; MAGGESE, M. C.; PAZ D. A.; STRUSMANN, C. A. Structure and cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Fisheries Science**, v. 63, p. 64-68, 1997.

VITT, U. A.; HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. W. Evolution and Classification of Cystine Knot-Containing Hormones and Related Extracellular Signaling Molecules. **Molecular Endocrinology**, v. 15, p. 681-694, 2001.

VONGVATCHARANON, U.; KIRIRAT, P.; SUWANJARAT, J.; BOONYOUNG, P. Alteration of gonadotrophs in the pituitary gland during the annual reproductive cycle of the adult female sand goby (*Oxyeleotris marmoratus*). **Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 437-445, 2005.

WELTZEIN, F. A.; KOBAYASHI, T.; ANDERSSON, E.; NORBERG, B.; ANDERSEN, Ø. 2003. Molecular characterization and expression of FSHb, LHb, and common α subunit in males Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 131, 87-96, 2003.

WELTZIEN, F. A.; ANDERSSON, E.; ANDERSEN, O.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; NORBERG, B. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 137, p. 447-477, 2004.

WELTZIEN, F. A.; HILDAHL, J.; HODNE, K.; OKUBO, K.; HAUG, T. M. Embryonic development of gonadotrope cells and gonadotropic hormones – Lessons from a model fish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 385, p. 18-27, 2014.

WELTZIEN, F. A.; NORBERG, B.; SWANSON, P. Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **General and Comparative Endocrinology**, v. 131, p. 97-105, 2003.

WONG, T. T.; ZOHAR, Y. Novel expression of gonadotropin α subunit genes in oocytes of the gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Endocrinology**, v. 145, p. 5210-5220, 2004.

WU, F.; ZHANG, X.; ZHANG, W.; HUANG, B.; LIU, Z.; HU, C.; WANG, D. Expression of three gonadotropin subunits in Southern catfish gonad and their possible roles during early gonadal development. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 153, p. 44-48, 2009.

YARON, Z.; LEVAVI-SIVAN, B. Endocrine regulation of fish reproduction. In: Farrel, A. P. (Ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology: From genome to environment**. San Diego: Academic Press. volume 2, 2011. p. 1500-1508.

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

YOSHIURA, Y.; KOBAYASHI, M.; KATO, Y.; AIDA, K.. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin β subunits (GTH-Ib and -IIb) from the goldfish, *Carassius auratus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 105. P. 379-389, 1997.

ZHOU, Y.; NIU, Y.; TAO, M.; DENG, X.; LIU, S.; LIU, Y.; LI, J. Molecular cloning, characterization and expression of FSH and LH beta subunits from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 36, p. 213-221, 2010.

ZMORA, N.; KAZETO, Y.; KUMAR, R. S.; SCHULZ, R. W.; TRANT, J. M. Production of recombinant channel catfish (*Ictalurus punctatus*) FSH and LH in S2 Drosophila cell line and an indication of their different actions. **Journal of Endocrinology**, v.194, p. 497- 416, 2007.

ZOHAR, Y.; MUÑOZ-CUETO, J. A.; ELIZUR, A.; KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 438-455, 2010.