

HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS EM PEIXES: ASPECTOS BÁSICOS E SUAS APLICAÇÕES

Robie Allan Bombardelli
Mirna Adriane Syperreck
Eduardo Antônio Sanches

BOMBARDELLI¹, R.A.; SYPERRECK², M.A.; SANCHES³, E.A. Hormônio liberador de gonadotrofinas em peixes: aspectos básicos e suas aplicações. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.59-65, 2006

RESUMO: O objetivo deste trabalho é revisar alguns aspectos relacionados ao estudo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e sua aplicação na manipulação dos processos reprodutivos em peixes. Esse neurohormônio é um decapeptídeo presente no hipotálamo e em diferentes regiões do cérebro, sendo considerado um dos fatores de maior importância no processo de síntese e liberação das gonadotrofinas pelas células endócrinas da pituitária. O GnRH apresenta variantes moleculares, podendo estar presente nos peixes em duas ou três formas, as quais, além de estimular os gonadótrofos da pituitária, podem exercer ação sobre somatótrofos e células que expressam prolactina e somatolactina. No últimos anos, diversos estudos têm sido direcionados para o desenvolvimento de metodologias que empregam formas nativas ou sintéticas de GnRH, a fim de manipular os processos reprodutivos em peixes, com relativo sucesso. Contudo novos estudos devem ser realizados para conhecer melhor a neurobiologia dessas moléculas, levando ao desenvolvimento de formas sintéticas, análogas de GnRH (GnRHa) específicas superativas, que apresentem maior atividade biológica. O desenvolvimento de doses mínimas efetivas e de mecanismos de liberação contínua mais eficientes deverá com certeza ser objeto de estudo futuro.

PALAVRAS - CHAVE: GnRH. Endocrinologia reprodutiva. Peixes.

GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE IN FISH: BASIC ASPECTS AND ITS APPLICATIONS

BOMBARDELLI¹, R.A.; SYPERRECK², M.A.; SANCHES³, E.A. Gonadotropin-releasing hormone in fish: Basic aspects and its applications. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.59-65, 2006

ABSTRACT: The objective of this work is to review some aspects related to the study of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its application in the manipulation of the reproductive processes in fish. This neurohormone is a decapeptide present in hypothalamus and in different regions of the brain, being considered one of the factors of biggest importance in the process of gonadotropin synthesis and release from endocrine pituitary cells. Different GnRH molecular forms had been present in fish in two or three forms, which besides stimulating the pituitary gonadotropins; it can exert some action on somatotropins and cells that express prolactin and somatolactin. In the last years, several studies have been directed to the development of methodologies using native or synthetic forms of GnRH, in order to manipulate the reproductive processes in fish, with relative success. However, new studies must be carried through to get to know the neurobiology of these molecules better, leading to the development of specific and analog forms of super active GnRHa which present greater biological activity. The development of minimum effective doses and more efficient mechanisms of continuous release will be the object of a future study.

KEY WORDS: GnRH. Reproductive endocrinology. Fish.

HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS EN PECES: ASPECTOS BÁSICOS Y SUS APLICACIONES

BOMBARDELLI¹, R.A.; SYPERRECK², M.A.; SANCHES³, E.A. Hormona liberadora de gonadotropinas en peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.59-65, 2006

RESUMEN: El objetivo de este trabajo es revisar algunos aspectos relacionados con el estudio de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y su aplicación en la manipulación de los procesos reproductivos en peces. Esta neurohormona es un decapeptido presente en el hipotálamo y en diferentes regiones del cerebro y es considerado como uno de los factores de mayor importancia en el proceso de síntesis y liberación de las gonadotropinas por las células endócrinas de la pituitaria. El GnRH se presenta como variantes moleculares, pudiendo estar presente en los peces en dos o tres formas, las cuales además de estimular los gonadótrofos de la pituitaria, pueden ejercer acción sobre somatótrofos y células que expresan prolactina y somatolactina. En los últimos años, diversos estudios han sido dirigidos para el desarrollo de metodologías que empleen formas nativas o sintéticas de GnRH, a fin de conducir los procesos reproductivos en peces, con relativo éxito. Sin embargo,

¹Professor Assistente do Curso de Engenharia de Pesca UNIOESTE – Campus de Toledo. Engenheiro de Pesca, Mestre em Zootecnia – Área de Concentração Produção Animal. Rua da Faculdade, nº 645, Jardim La Salle, CEP-85903250, Toledo, PR, Brasil. E-mail: rabombardelli@unioeste.br; rabombardelli@ibest.com.br.

²Zootecnista. E-mail: masyperreck@bol.com.br.

³E-mail: eduanches@hotmail.com.

nuevos estudios deben ser realizados para conocer mejor la neurobiología de estas moléculas, llevando al desarrollo de formas sintéticas de GnRH específicas, superactivas que presenten mayor actividad biológica. Todavía, el desarrollo de dosis mínimas efectivas y de mecanismos de liberación continua más eficientes, ciertamente será objeto de estudio futuro.

PALABRAS CLAVE: GnRH. Endocrinología reproductiva. Peces.

Introdução

O controle dos processos reprodutivos na aquicultura é indispensável para o sucesso da atividade. Nesse processo, fatores ambientais e ferormônios são percebidos e transduzidos pelo cérebro em sinais neuroendócrinos para a regulação da secreção pela pituitária das gonadotrofinas (GtH – I e II), as quais desempenham papel fundamental no desenvolvimento gonadal (PETER & YU, 1997). O principal neurohormônio envolvido nesse processo de transdução de sinais é o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual está presente em diversas regiões cerebrais e hipotalâmicas nos peixes (YAMAMOTO, 2003).

O GnRH é um decapeptídeo e encontra-se presente nos peixes teleósteos podendo existir em duas ou três formas de variantes moleculares (CAROLSFELD *et al.*, 2000). Essas diferentes formas apresentam diferentes potenciais de estimulação da pituitária para a síntese e liberação de GtH – I e II. Nesse sentido, o emprego desses neurohormônios no processo de manipulação hormonal da reprodução pode apresentar algumas vantagens como: a) GnRHs são pequenas moléculas aparentemente incapazes de desencadear resposta imune; b) GnRHs são capazes de atuar em altos níveis do eixo hipotálamo – pituitária – gônadas e; c) GnRHs são sintetizados quimicamente e não causam o risco de transmitir doenças aos reprodutores (ZOHAR & MYLONAS, 2001).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm sido direcionados para o desenvolvimento de metodologias, empregando o GnRH e seus análogos sintéticos superativos, no controle e manipulação da reprodução de peixes de importância econômica na aquicultura. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo revisar os diversos aspectos, tanto de cunho básico quanto aplicado, relacionados com o hormônio liberador de gonadotrofinas, em peixes.

Revisão de Literatura

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH): seu estudo, localização e atividade

O hormônio liberador de gonadotrofina é um decapeptídeo (HARVEY & CAROLSFELD, 1993; DELLOVADE *et al.*, 1998) bastante conhecido, o qual apresenta a função de estimular a síntese e liberação de gonadotrofinas pela pituitária, exercendo, dessa forma, grande importância na regulação do processo de gametogênese (ZOHAR *et al.*, 1995) e maturação gonadal (AMANO *et al.*, 2002).

As primeiras evidências da atividade do GnRH, no hipotálamo de peixes teleósteos, foram verificadas em 1971, quando BRETON e colaboradores realizaram a adição de extrato hipotalâmico (EH) de carpa (*Ciprinus carpio*) em culturas *in vitro* de pituitária de carpa e verificaram o aumento dos níveis de GtH (PETER, 1983).

Apesar dos estudos iniciais relacionados com o isolamento de GnRH em mamíferos sugerir sua presença

apenas no hipotálamo, estudos subseqüentes, por volta de 1972, evidenciaram neurônios de GnRH em outras áreas fora do hipotálamo (YAMAMOTO, 2003). Após essas descobertas, MUNZ *et al.* (1981) evidenciaram em Platyfish (*Xiphophorus*), neurônios de GnRH em regiões extra-hipotalâmicas como o nervo terminal, além do grupo de células da região pré-óptica. Esse fato levou a sugerir a existência de três tipos distintos de populações de células de GnRH: grupos do nervo terminal, da região hipotalâmica pré - óptica e do encéfalo médio.

Desde então, várias descobertas têm demonstrado a presença do GnRH em diversas espécies de vertebrados, apresentando ao menos 14 formas moleculares diferentes (MYLONAS & ZOHAR, 2001; PARHAR *et al.*, 2002), sendo que a diferença molecular encontrada entre as formas é apenas de um a três aminoácidos (YAMAMOTO, 2003). Dessa forma, a nomenclatura das diferentes formas segue a inicial do nome da espécie em que foi pela primeira vez identificada (YAMAMOTO, 2003).

A estrutura básica da molécula de GnRH, originalmente identificada em mamíferos, é pGlu – His – Trp – Ser – Tyr – Gly – Leu – Arg – Pro – Gly – NH₂ (PETER & YU, 1997; MYLONAS & ZOHAR, 2001). A estrutura de outras formas de GnRH encontradas em diferentes espécies de vertebrados está apresentada na Figura 1.

Apesar de uma determinada forma de GnRH ser evidenciada inicialmente em alguma espécie, isso não impede a sua presença em outras, mesmo que distantes na escala evolutiva (YAMAMOTO, 2003).

Em geral, nos peixes teleósteos podem existir duas ou três formas de GnRH. A única forma constante dentro dos vertebrados, desde os peixes cartilaginosos até os primatas, é o cGnRH-II (das aves). Assim, os peixes que apresentarem duas formas, terão na sua segunda forma, o sGnRH (salmão), mGnRH (mamíferos) ou então cfGnRH (catfish) (AMANO *et al.*, 2002) com variantes. Logo, as espécies que apresentarem três formas de GnRH poderão ser relatadas as formas cGnRH-II e sGnRH como constantes e sbGnRH (sea bream) (AMANO *et al.*, 2002) ou mdGnRH (medaka) ou hrGnRH (herring) (CAROLSFELD *et al.*, 2000; OKUBO *et al.*, 2000) como variantes.

A presença dessas diferentes formas de GnRH no cérebro sugere diferentes distribuições e funções; contudo essa ação fisiológica ainda não é completamente conhecida (AMANO *et al.*, 2002). Esses autores, a partir da técnica de hibridação *in situ*, verificaram a expressão de três formas de GnRH em “Barfin flounder” e em regiões diferentes, sendo estas sGnRH (região do bulbo olfatório), cGnRH-II (região do tegumento do cérebro médio) e sbGnRH (região da área pré – óptica) (Figura 2). Considerando as evidências de que as fibras nervosas de sbGnRH se estendem até a pituitária e que a forma dominante de GnRH essa glândula é o sbGnRH, sugere-se que essa forma de GnRH esteja relacionada diretamente com a liberação de GtH. KOBAYASHI *et al.* (1994) também verificaram maior importância relativa da

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mammalian GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Guinca pig GnRH	pGlu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Chicken GnRH-I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly-NH ₂
Chicken GnRH-II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH ₂
Rana GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Typ	Pro	Gly-NH ₂
Dogfish GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂
Herring GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Salmon GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂
Catfish GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly-NH ₂
Medaka GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Seabream GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Lamprey GnRH-III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂
Lamprey GnRH-I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂
Tunicate GnRH-I	pGlu	His	Trp	Ser	Asp	Tyr	Phe	Lys	Pro	Gly-NH ₂
Tunicate GnRH-II	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Cys	his	Ala	Pro	Gly-NH ₂

Figura 1 - Sequência de aminoácidos de 15 formas de GnRH conhecidas em vertebrados e urocordatos. Os aminoácidos em negrito diferem da forma básica dos vertebrados (YAMAMOTO, 2003)

região pré-óptica em fêmeas de “Goldfish”, nos processos relacionados com a liberação de gonadotrofinas estimulada pelo GnRH. Por outro lado, apesar das fibras de sGnRH também se estenderem até a pituitária, as formas sGnRH e cGnRH - II, parecem atuar como neuromoduladores.

Em “Gilthead Seabream”, as três formas de GnRH encontradas são sGnRH, cGnRH-II e sbGnRH, todas com atividade estimuladora de liberação de GtH. Apesar das três formas estarem presentes na pituitária dessa espécie, a forma de maior importância para desencadear o processo de liberação de GtH - II é a sbGnRH, mesmo sendo a forma menos ativa, contudo encontrada em maior concentração na pituitária (ZOHAR *et al.*, 1995). Em machos de “Sea bass” as mesmas três formas de GnRH expressas no cérebro são encontradas na pituitária, tanto no período de diferenciação sexual quanto na primeira maturação (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000).

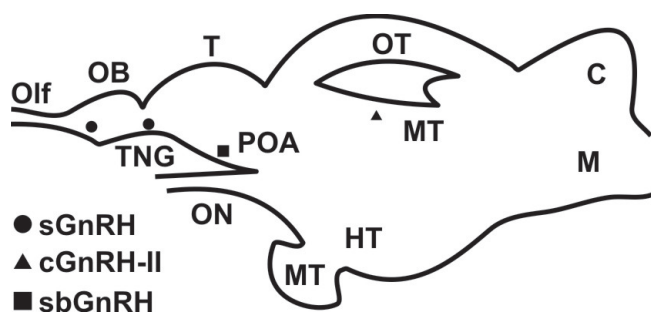


Figura 2 - Desenho esquemático da localização da expressão das três diferentes formas de GnRH em “Barfin flounder”. OB - bulbo olfatório; MT - tegumento do cérebro médio e POA - região pré-óptica. Adaptado de AMANO *et al.* (2002)

Em outras espécies de peixes como “Gilthead

Seabream”, “Striped Bass”, e “African Catfish” apesar da presença das três formas de GnRH, a forma cGnRH-II é mais ativa na função de estimular a secreção de GtH-II (PETER & YU, 1997).

No futuro, estudos bioquímicos e neurobiológicos dessas moléculas poderão elucidar a endocrinologia reprodutiva das diversas espécies de peixes, o que poderá auxiliar no desenvolvimento de técnicas de manipulação da maturação gonadal a partir do emprego de hormônios sintéticos específicos e de alta eficiência.

Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) como estimulador da pituitária na liberação de hormônios

Na maioria dos peixes teleostes, a distribuição do GnRH nos gonadotrófos da pituitária se dá por inervação direta, o que permite o controle neural das funções da pituitária (REDDING & PATIÑO, 1993). Contudo, essa ligação é uma exceção em alguns peixes em que o sistema porta hipotálamo-hipofisário está presente (VAN DER KRAAK *et al.*, 1997).

Dentre os diversos estimuladores dos gonadotrofos, as diferentes formas de GnRH são consideradas como sendo os mais importantes. O controle do desenvolvimento e maturação gonadal é controlado pelo GtH estimulado pelo GnRH cerebral e pituitário (AMANO *et al.*, 1994).

Um dos aspectos mais estudados com relação ao mecanismo de ação do GnRH em peixes está relacionado principalmente com a síntese e liberação de GtH-II. Isso, porque, provavelmente, nas fêmeas (PETER & YU, 1997) e machos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000), a ovulação e espermação, respectivamente, somente ocorram em resposta à liberação de GtH-II. Peter & Yu (1997) verificaram uma relação inversa entre os níveis de GnRH cerebral (regiões bulbo-olfatórias, telencéfalo, região pré-óptica e hipotálamo) e GtH-II pituitário em fêmeas próximas do período de desova.

Klausen *et al.* (2001) verificaram em *Carassius auratus* que as duas formas de GnRH presentes nesta espécie (sGnRH e cGnRH-II) podem estimular a síntese das subunidades GtH- α , e GtH-I- β e GtH-II- β pela pituitária. Além disso, as formas sGnRH e cGnRH - II também estimulam a síntese e liberação de GH pela pituitária. A sincronia entre os picos de GtH-II e GH em períodos pré ovulatórios (MELAMED *et al.*, 1998) é freqüente e regulada por um mecanismo neuroendócrino multifatorial, em que o GnRH é um dos fatores influentes (PETER & YU, 1997).

Além das evidências de que esse neuropeptídeo regula a síntese e secreção de GH, outros autores têm verificado que as fibras de GnRH alcançam as células produtoras de somatolactina da pituitária em *O. mykiss* (PAHAR & IWATA, 1994) e ainda atuam como fator liberador de prolactina em *O. mossambicus* (WEBER *et al.*, 1997). Stefano *et al.* (1999) evidenciaram em Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) sítios de ligação de GnRH com ao menos quatro tipos de células pituitárias: gonadótrofos, somatótrofos e células que expressam prolactina e somatolactina, sugerindo que esse neuropeptídeo poderia regular a síntese e/ou a liberação desses hormônios. Segundo Parhar *et al.* (2002), a habilidade do GnRH dos peixes ósseos em estimular essas células sugere a existência de diferentes formas de receptores de GnRH (tipo IA, IB, e III), o que permite a regulação diferente e, em algum grau, das células endócrinas da pituitária. Apesar das poucas evidências da função fisiológica da somatolactina relacionada com a reprodução, essa parece estimular a esteróidogênese gonadal *in vitro* em Salmão Coho (*Oncorhynchus kisutch*) (PLANAS *et al.*, 1992). Okubo *et al.* (2003) recentemente encontraram uma nova forma de receptor de GnRH em “medaka” (*Oryzias latipes*), denominado de GnRH - R3, o qual parece exercer função de mediar a transdução de sinais induzidos pelas formas cGnRH - II e sGnRH no cérebro.

De forma contrária ao GtH-II, existem poucos dados a respeito dos efeitos do GnRH sobre o controle da síntese e liberação de GtH-I (BRETON *et al.*, 1998). Contudo, o aumento da liberação dessa gonadotrofina em resposta ao GnRH tem sido verificado em *Oncorhynchus kisutch*, durante as fases iniciais da espermatogênese e em fêmeas vitelogênicas de truta arco-íris (VAN DER KRAAK *et al.*, 1997). Por outro lado, BRETON *et al.* (1998) não verificaram em truta arco-íris efeito significativo do GnRH sobre a liberação *in vivo* de GtH-I, apesar de ter sido verificado *in vitro* em animais imaturos. Esses autores sugeriram que provavelmente exista um fator inibitório *in vivo* que ainda não tenha sido evidenciado.

O GnRH também parece exercer funções no controle do início da diferenciação sexual. Rodríguez *et al.* (2000) verificaram que as três formas de GnRH (sGnRH, cGnRH-II, sbGnRH) presentes em “European Sea Bass” (*Dicentrarchus labrax*, L.) permaneceram em níveis maiores no início da diferenciação sexual, em comparação ao período de primeira maturação gonadal. Isso leva a sugerir que as três formas de GnRH estão envolvidas no processo de diferenciação sexual em “Sea Bass”.

Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seus mensageiros secundários: estímulo e inibição

Mukhopadhyay *et al.* (1997) sugerem que uma

casca de eventos ocorra na pituitária em resposta à ação do GnRH. Esses autores verificaram que em *Channa punctatus* o cGnRH parece estimular a liberação de GtH em duas fases: inicialmente uma liberação aguda dos estoques de GtH envolvendo Ca^{+2} (VAN DER KRAAK *et al.*, 1997) e Calmodulina quinase II (CaM quinase II), seguida por uma segunda fase de liberação contínua de GtH, envolvendo a sistema adenil ciclase (cAMP) e proteína quinase A (PKA).

A fase de liberação aguda de GtH ocorre em resposta a um influxo de Ca^{+2} do meio extra para intracelular, através dos canais de cálcio sensíveis à voltagem (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1997). Isso foi verificado por esses autores, quando bloquearam o influxo de cálcio com “verapamil” e verificaram que a liberação de GtH também era bloqueada, sugerindo, dessa forma, a importância obrigatória desses canais para mediar o efeito do cGnRH na liberação aguda de GtH pelas células pituitárias de *Channa punctatus*. Da mesma forma, o aumento do Ca^{+2} intracelular é o responsável pela ativação da CaM quinase II e cAMP, para atuarem na primeira e segunda fase de liberação, respectivamente (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1997).

Segundo Melamed *et al.* (1998), células pituitárias de tilápias expostas ao sGnRH leva ao aumento dos níveis de RNAm GtH-II β , sendo esse aumento mediado pela ativação de ambas PKA e proteína quinase C (PKC).

A habilidade do GnRH em estimular o aumento de inositol trifosfato (InsP3) indica que a fosfolipase C (PLC) (VAN DER KRAAK *et al.*, 1997), por mediar sua hidrólise (GRANNER, 1998), pode fazer parte do caminho de transdução do sinal do GnRH. Além disso, InsP3 é conhecido por estimular a liberação de Ca^{+2} dos estoques intracelulares (VAN DER KRAAK *et al.*, 1997), como o retículo sarcoplasmático e mitocôndrias, promovendo a ativação da PKC e o aumento do cálcio iônico citoplasmático (GRANNER, 1998).

Segundo Van Der Kraak *et al.* (1997), outros mensageiros utilizados pelo GnRH para estimular a liberação de GtH são a fosfolipase A2 (PLA2) e o ácido araquidônico (AA), especialmente pela mobilização e metabolismo do AA pela PLA2.

Dentre os agentes inibitórios da ação do GnRH, as dopaminas (DA) apresentam maior importância. Sabe-se que as DA inibem a liberação de GtH, tanto em nível basal, quanto a liberação estimulada pelo GnRH (PETER & YU, 1997). O mecanismo de inibição parece ser mediado por diversos pontos na cascata de transdução de sinais que regula a liberação de GtH a partir de estímulos de GnRH, sendo as principais ações a inibição da mobilização do Ca^{+2} e a inibição da geração de cAMP (VAN DER KRAAK *et al.*, 1997). Essa inibição regula a magnitude e sensibilidade da liberação de GtH-II além de controlar os níveis de liberação de GtH-II na segunda fase de liberação.

Aplicações do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no controle e manipulação endócrina da reprodução

Atualmente, um grande número de espécies de peixes necessitam de algum tipo de tratamento hormonal para controlar ou induzir a reprodução. Apesar de diversas técnicas de manipulação hormonal serem empregadas atualmente com sucesso, alguns problemas têm sido

evidenciados como o fato do animal estar em estágio de desenvolvimento gonadal avançado e as múltiplas aplicações hormonais necessárias para atingir o sucesso na reprodução (MYLONAS & ZOHAR, 2001).

O processo de reprodução artificial de diversas espécies de peixes apresentam diversos problemas que levam às disfunções do processo reprodutivo, tais como: ausência de vitelogênese e maturação final dos ovócitos em fêmeas e reduzida capacidade de realizar a espermatogênese e espermição dos machos, levando à produção de sêmen de baixa quantidade e qualidade (MYLONAS & ZOHAR, 2001).

O desenvolvimento de procedimentos farmacológicos que viessem a aperfeiçoar os processos de indução a maturação final em peixes foram bastante estudados nos últimos anos. Inicialmente, o estudo das gonadotrofinas foi bastante intenso, contudo, nas últimas duas décadas, diversos pesquisadores focaram o estudo para o uso de formas de GnRH nativas ou sintéticas (GnRHa) e seus análogos hiperativos (ZOHAR *et al.*, 1989; GISSIS *et al.*, 1991; TAN-FERMIN *et al.*, 1997; OLITO *et al.*, 2001; MOON *et al.*, 2003; MARINO *et al.*, 2003).

O emprego desses compostos apresentam diversas vantagens com relação ao uso das gonadotrofinas: os GnRHa são pequenos decapeptídeos aparentemente incapazes de desencadear resposta imune; são capazes de atuar em altos níveis do eixo hipotálamo–pituitária–gônadas, podendo proporcionar uma estimulação mais balanceada dos eventos reprodutivos e possivelmente melhor integração com outras funções fisiológicas, que direta ou indiretamente afetam os processos endócrinos reprodutivos; são sintetizados quimicamente e não causam o risco de transmitir doenças aos reprodutores, perigo este, sempre associado ao uso dos extratos de pituitária (ZOHAR & MYLONAS, 2001).

As formas sintéticas de GnRHa são desenvolvidas a fim de melhorar a sua resistência na circulação sanguínea contra a degradação enzimática e aumentar o tempo de resistência na circulação em comparação às formas nativas (MYLONAS & ZOHAR, 2001). Infelizmente a forma mais resistente de GnRHa leva 23 minutos para ser degradada em comparação a cinco minutos na forma nativa sGnRH (GOTHILF & ZOHAR, 1991 *apud* MYLONAS & ZOHAR, 2001). Esse reduzido tempo de resistência na corrente sanguínea certamente pode justificar as falhas na indução à ovulação quando protocolos que utilizam apenas uma única aplicação hormonal, o que possivelmente não induz ao aumento dos níveis de GtH-II (TAN-FERMIN *et al.*, 1997). Além disso, a maturação final dos ovócitos não é alcançada imediatamente após a aplicação de GnRH, pois é necessário que altos níveis de GnRHa sejam mantidos nesse período para garantir a liberação adequada de GtH, sendo esse período dependente da espécie e do estágio de desenvolvimento gonadal (MYLONAS & ZOHAR, 2001), apresentando melhores respostas dentro da estação reprodutiva (TAN-FERMIN *et al.*, 1997).

Nesse sentido, diversos experimentos têm focado o emprego de múltiplas aplicações hormonais. Slater *et al.* (1995) empregaram duas aplicações na forma injetável e com intervalos de dois dias entre aplicações em “Sockeye Salmon” (*Oncorhynchus nerka*) e verificaram efeito positivo

quanto à redução do tempo necessário para os animais atingirem a ovulação e a espermição, sendo essa redução de tempo de 21 para 11 dias e de 24 para 10 dias, para animais contidos em água doce e água salgada, respectivamente. Contrariamente aos resultados apresentados anteriormente, SURESH *et al.* (2000) alcançaram bons resultados de indução à ovulação em “White Bass”, utilizando apenas uma dose aguda, aplicada na forma injetável de mGnRHa.

Outros trabalhos têm buscado desenvolver metodologia de liberação contínua de GnRH, como por exemplo o uso do implantes hormonais. Marino *et al.* (2003) utilizou implantes de GnRHa para induzir a ovulação em “Dusky Grouper” (*Epinephelus marginatus*) e verificaram que das 13 fêmeas tratadas, 11 atingiram a maturação final dos ovócitos, enquanto que as não tratadas desenvolveram apenas alguns sinais de maturação. Olito *et al.* (2001) utilizaram implantes de LHRHa em “Chinook Salmon” e verificaram que esses tratamentos além de acelerar a ovulação em relação aos animais não tratados, induziram a sincronização da ovulação das fêmeas. Esses autores verificaram que todas as fêmeas tratadas ovularam 17 dias após o início dos tratamentos, enquanto as não tratadas atingiram esse estágio por volta do 38º dia. Apesar de acelerar o tempo de maturação final dos ovócitos, os autores verificaram que os implantes reduzem a qualidade e a sobrevivência das proles.

Moon *et al.* (2003) utilizaram implantes de GnRHa (LHRHa – pGlu-His-Trp-Ser-yr-D-Ala-Leu-Arg-Pro-NH₂) em machos de “Starry Flounder” (*Plathchthys stellatus*) durante a estação de reprodução e verificaram que os tratamentos não afetaram a motilidade espermática nem o pH do sêmen, mas aumentaram o volume de sêmen ejaculado e a sua fluidez. Esse fato, conseqüentemente, levou a uma redução da concentração de espermatozoides, provavelmente pelo GnRHa não estimular a produção de novos espermatozoides. O aumento da fluidez do sêmen pode ser um resultado positivo, pois a elevada viscosidade desse material, freqüente em animais de cativeiro, é um problema na reprodução artificial, pois dificulta a homogeneização do sêmen com as soluções ativadoras. Hilomen-garcia *et al.* (2002) evidenciaram os mesmos efeitos sobre a qualidade e quantidade de sêmen produzido em “Sea Bass” (*Calcarifer bloch*), contudo esses autores utilizaram LHRHa (D-Ala₆, Pro₉-N-ethylamida) na forma injetável. Mylonas *et al.* (1997) encontraram resultados semelhantes utilizando implantes de GnRHa em forma de micro esferas em “White Bass” (*Morone chrysops*), porém esses implantes não causaram efeito deletério na concentração de espermatozoides, além de evidenciarem um aumento nos níveis de GtH-II.

Principais compostos empregados no desenvolvimento de sistemas de liberação contínua de GnRHa

Os tratamentos hormonais têm utilizado diversos tipos de veículos com diferentes eficiências. Considerando que as formas de aplicações injetáveis necessitam de excessivo manejo, devido à repetição dos tratamentos, muitos estudos têm sido direcionados para o desenvolvimento de metodologias utilizando implantes hormonais que permitam a liberação contínua de hormônio.

Diversos compostos têm sido utilizados na confecção desses implantes. Esses podem ser feitos na forma de peletes

cilíndricos de colesterol (3mmx3mm), em que variações de sua concentração na matriz, em adição com celulose, pode garantir uma rápida ou lenta liberação (ZOHAR & MYLONAS, 2001). Peletes de acetato de etilenovinil também são utilizados, sendo que esse composto é um co-polímero não degradável e os implantes são confeccionados de forma cilíndrica com 2 a 3 mm de diâmetro (MYLONAS & ZOHAR, 2001). Desde 2001 implantes fabricados na forma de micro-esferas biodegradáveis (5-200µm de diâmetro) têm sido largamente utilizados e com bons resultados. Na sua fabricação, são empregados co-polímeros de ácido láctico e ácido glicólico (LGA), os quais foram inicialmente desenvolvidos para emprego em suturas cirúrgicas. A liberação dessas microesferas pode ser imediata ou continuar por alguns meses, dependendo da relação entre ácido láctico e glicólico e comprimento dos implantes empregados, o que causa alteração no peso molecular do polímero (ZOHAR & MYLONAS, 2001).

Considerações Finais

O emprego do GnRH e suas formas análogas têm mostrado eficiência no controle e manipulação da reprodução de peixes, além de facilitar o manejo dos estoques de reprodutores. Contudo novos estudos devem ser realizados, buscando-se conhecer melhor as formas nativas de GnRH presentes em cada espécie e suas relativas localizações, mecanismos de ação e afinidade com seus receptores. Esse conhecimento poderia levar ao desenvolvimento de formas sintéticas de GnRHs específicas, superativas, ou combinações mais apropriadas, que apresentem maior atividade biológica nos processos de maturação final dos ovócitos, ovulação, espermição e desova. Ainda, o desenvolvimento de doses mínimas efetivas e de mecanismos de liberação contínua mais eficientes deverá ser objeto de estudo futuro.

Referências

AMANO, M. *et al.* Molecular cloning of three cDNAs encoding different GnRHs in the brain of barfin flounder. *General Comparative Endocrinology*, Orlando, v. 126, p. 325-333, 2002.

AMANO, M. *et al.* Salmon gonadotropin – releasing hormone and gonadotropin are involved in precocious maturation induced by photoperiod manipulation in underyearling male Masu Salmon, *Oncorhynchus masou*. *General and Comparative Endocrinology*, Orlando, v. 95, p. 368-373, 1994.

BRETON, B. *et al.* 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*, Orlando, v. 111, p. 38-50, 1998.

CAROLSFELD J. *et al.* Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinology*, Baltimore, v. 141, p. 505-512, 2000.

DELLOVADE, T. *et al.* Aspects fo GnRH neurobiology conserved across vertebrate forms. *General and Comparative Endocrinology*, Orlando, v. 112, p. 276-282, 1998.

GISSIS, A. *et al.* The effect of gonadotropin-releasing hormone superactive analog and dopamine antagonists on gonadotropin level

and ovulation in tilapia hybrids. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh*, Israel, v. 43, n. 4, p.123-136, 1991.

GRANNER, D. K. Restraint. In: _____. *Ação hormonal*. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 509-521.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: International Development Research Center, 1993.

HILOMEN-GARCIA, G. V. *et al.* Milt production of Sea Bass, *Morone chrysops*, administred an analogue of luteinizing hormone-releasing hormone and 17- α -methyltestosterone. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh*, Israel, v. 54, n. 4, p. 173 -182, 2002.

KLUSEN, C. *et al.* The effect of gonadotropin – releasing hormone on growth hormone and gonadotropin subunit gene expression in the pituitary of goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, New York, v. 129, p. 511-516, 2001.

KOBAYASHI, M. *et al.* Gonadotropin – releasing hormones of terminal nerve origin are not essential to ovarian development and ovulation in goldfish. *General and Comparative Endocrinology*, Orlando, v. 95, p. 192-200, 1994.

MARINO, G. *et al.* Induction of ovulation in captive – reared dusky grouper, *Epinephelu marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained – release GnRHs implant. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 219, p. 841-858, 2003.

MELAMED, P. *et al.* Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, Oxford, v. 119, p. 325-338, 1998.

MOON, S. H. *et al.* Increased plasma 17-hydroxyprogesterone and milt production in response to gonadotropin-releasing hormone agonist in captive male starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 218, p. 703-716, 2003.

MUKHOPADHYAY, B. *et al.* Intracelular events in response to GnRH causing gonadotropin release from pituitary cells of a channid fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, v. 118c, n. 2, p. 129-136, 1997.

MÜNZ, H. *et al.* LHRH systems in the brain of platyfish. *Brain Research*, Amsterdam, v. 221, p.1-13, 1981.

MYLONAS, C. C. *et al.* Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained – released GnRHs delivery system. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 153, p. 301-311, 1997.

MYLONAS, C. C.; ZOHAR, Y. Use of GnRHs – delivery system for the control of reproduction in fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, London, v. 10, p. 463-491, 2001.

OKUBO, K. *et al.* A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochemistry Biophysics Research Commun*, Amsterdam, v. 276, p. 298-303, 2000.

_____. A novel third gonadotropin releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*: evolutionary and functional implications. *Gene*, Amsterdam, v. 314, p. 121-131, 2003.

OLITO, C. *et al.* Acceleration of sexual maturation in Chinook Salmon broodstock using luteinizing hormone-releasing hormone analog. *North American Journal of Aquaculture*, Bethesda, v. 63, p. 208-214, 2001.

PAHAR, S. I.; IWATA, M. Gonadotropin - releasing hormone

- (GnRH) neurons project to growth hormone and somatotropin cell in the Steelhead trout. *Histochemistry*, Berlin, v. 102, p. 195-203, 1994.
- PARHAR, I. S. *et al.* Spatio – temporal expression of gonadotropin – releasing hormone receptor subtypes n gondotropes, somatotropes and lactotropes in cichlid fish. *Journal of Neuroendocrinology*, Oxford, v. 14, p. 657-665, 2002.
- PETER, R. E. The brain and neurohormones in teleost reproduction. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. *Fish physiology*. London: Academic Press, 1983. p. 97-135.
- PETER, R. E.; YU, K. L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews in fish biology and fisheries*, London, v. 7, p. 173-197, 1997.
- PLANAS, J. V. *et al.* Somatotropin stimulates *in vitro* gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, Orlando, v. 87, p. 1 -5, 1992.
- REDDING, J. M.; PATIÑO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D. H. *The physiology of fishes*. London: CRC Press, 1993. p. 503-534.
- RODRÍGUEZ, L. *et al.* Pituitary levels of three forms of GnRH I male Europe Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *General and Comparative Endocrinology*, Orlando, v.120, p. 67-74, 2000.
- SLATER, C. H. *et al.* GnRH injection accelerate final maturation an ovulation/spermiation of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in both fresh and salt water. *Aquaculture*, Amsterdam, v.130, p. 279-285, 1995.
- STEFANO, A. V. *et al.* Colocalization of GnRH binding sites with gonadotropin-, somatotropin-, and prolactin – expressing pituitary cells of the Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*, Orlando, v. 116, p. 133-139, 1999.
- SURESH, A. V. *et al.* Single injections of human chorionic gonadotropin or mammalian gonadotropin releasing hormone analog at low dosages induce ovulation in White Bass. *North American Journal of Aquaculture*, Bethesda, v. 62, p. 87-94, 2000.
- TAN-FERMIN, J. D. *et al.* LHRHa and pimozide-induced spawning of Asin catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) at different times during an annual reproductive cycle. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 148, p. 323-331, 1997.
- VAN DER KRAAK, G. *et al.* Reproduction. In: EVANS, D. H. *The physiology of fishes - 2thed.* London: CRC Press, 1997. p. 465-490.
- WEBER, G. M. *et al.* Evidence that gonadotropin – releasing hormone (GnRH) function as a prolactin – releasing factor in a teleost fish (*Oreochromis mossambicus*) and primary structures for three native GnRH molecules. *Journal of Endocrinology*, Bristol, v. 155, p. 121 -132, 1997.
- YAMAMOTO, N. Three gonadotropin – releasing hormone neural groups with special reference to teleosts. *Anatomical Science International*, London, v. 78, p. 139-155, 2003.
- ZOHAR, Y. *et al.* Gonadotropin – releasing activities of the three native forms of gonadotropin – releasing hormone present in the brain of Gilthead Seabream, *Spaurus auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, Orlando, v. 97, p. 289-299, 1995.
- ZOHAR, Y. *et al.* Induction of spawning in the gilthead seabream, *Spaurus aurata*, using (D-Ala⁶-Pro⁹-NET)-LHRH: comparison with the use of HCG. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, Israel, v. 41, n. 3, p. 105-113, 1989.
- ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 197, p. 99-136, 2001.

Recebido para publicação em 08/03/2005
 Received for publication on 08 March 2005
 Recibido para publicación en 08/03/2005
 Aceito para publicação em 01/11/2005
 Accepted for publication on 01 November 2005
 Acepto para publicación en 01/11/2005

UNIVERSIDADE PARANAENSE

PÓS-GRADUAÇÃO

STRICTO SENSU



Mestrado em:
Direito Processual
e Cidadania

Recomendado pela CAPES

Área de concentração:

- I. Direito Processual Civil
- II. Direito Processual Penal

Informações

www.unipar.br

Secretaria de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Tel: 44 3621-2885 e/ou 44 3621-2828, ramais 1285 e 1350
degpp@unipar.br

