

Novo método de indução à esterilidade em peixes adultos através da administração oral de etinilestradiol e gestodeno utilizando o lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) como um organismo modelo

Erika Cruz de OLIVEIRA¹; Giulia Isabelle Ventura Monte RAZO², Larissa FABRICIO³; Gabriella Braga CARVALHO; Lucia Suárez LÓPEZ; George Shigueki YASUI

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos - FZEA/USP¹; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP² e Fundação Hermínio Ometto - FHO³

erika.oliveira@usp.br¹; giulia.monterazo@gmail.com²; larissafabricio9@gmail.com³

Objetivos

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é um peixe neotropical ameaçado de extinção, com uma queda de 97% na extensão de ocorrência original (EOO) devido à pesca excessiva e destruição de habitats naturais. Em 2013, foi incluída na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas do ICMBio, classificada como uma espécie em perigo (EN) A2c.

Dadas as circunstâncias acima, o objetivo deste estudo é produzir receptores adultos estéreis da espécie lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*), que servirão como hospedeiros para a propagação mediada, biotecnologia popularmente conhecida como "barriga de aluguel". Tal procedimento permitirá que um lambari produza sêmen de piracanjuba, fornecendo uma estratégia viável para auxiliar na recuperação da espécie. A administração oral de etinilestradiol, gestodeno e a combinação de ambos pode induzir a regressão, possibilitando estabelecer o protocolo para o desenvolvimento de um receptor apto a ser uma quimera germinativa.

Métodos e Procedimentos

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os padrões éticos do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA/USP) sob o número #5450270519 e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

(SISBIO) #88195-1. Um total de 300 machos sexualmente maduros de lambari do rabo amarelo foram distribuídos em doze aquários de 60 litros, com a temperatura ajustada para 28°C e uma troca parcial de água diária de 10%. O experimento foi dividido em quatro grupos de aquários da seguinte forma: Controle (ração de manutenção); Gestodeno (5 mg/ml); Etinilestradiol (5 mg/ml); Gestodeno e Etinilestradiol (5 mg/ml e 5 mg/ml, respectivamente). Os hormônios foram adicionados a uma ração comercial para peixes e administrados duas vezes ao dia, sendo registrado diariamente o consumo de por aquário. Os tratamentos foram mantidos por 30 dias. Todos os tratamentos foram conduzidos em triplicata. Em intervalos de 15 dias, dois exemplares de cada aquário (ou seja, 6 peixes por tratamento) foram eutanasiados com uma overdose de eugenol (300 mg/L) (Biodinâmica, Brasil). Dados biométricos, como comprimento total (TL), comprimento padrão (SL), peso total (TW) e peso da gônada (GW), foram mensurados de cada indivíduo a fim de calcular o índice gonadossomático.

As gônadas coletadas foram processadas usando técnicas histológicas convencionais, com cortes em seções de 5 µm de espessura e coloração com Hematoxilina e Eosina (HE).

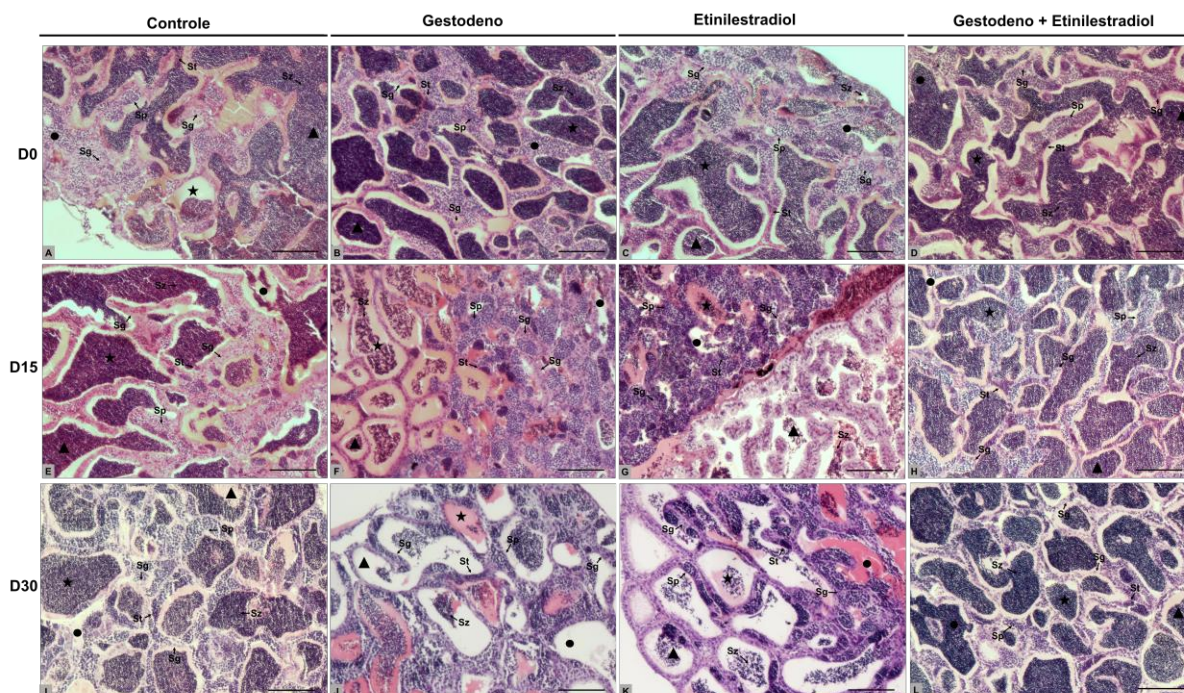


Figura 1. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*). D0: primeira coleta, efetuada no dia 13 de julho de 2023; D15: segunda coleta, no dia 28 de julho de 2023; D30: terceira coleta, efetuada no dia 11 de agosto de 2023. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; ★: Lúmen testicular; ●: Porção cranial/medial, com maior presença de epitélio germinativo, linhagem espermática ▲: Porção medial/caudal, com maior presença de interstício celular. Escala: A-L: 200 µm. Fonte: Autoria própria.

As lâminas histológicas foram analisadas no microscópio (Nikon-Ni, Tóquio, Japão) e imagens digitais foram obtidas com uma câmera CCD (Nikon DSRi2 Nikon, Tóquio JP), com o Nis-Ar Elements.

Resultados

Os tratamentos com gestodeno e etinilestradiol apresentaram resultados mais satisfatórios, com uma inibição significativa da espermatogênese, na região caudal do testículo, nas áreas evidenciadas pela cabeça da seta, pode-se observar uma área com depleção aumentada de espermatozoides, como evidenciado nas imagens 1F e 1G do D15 e nas imagens 1J e 1K do D30. Surpreendentemente, a combinação de ambos os hormônios não foi eficaz e não apresentou nenhuma alteração na espermatogênese, como exemplificado nas imagens 1H e 1L do dia 15 e do dia 30, respectivamente, indicando um padrão de espermatogênese semelhante ao grupo de controle, ou seja, sem tratamento hormonal.

Conclusões parciais

Concluimos que o gestodeno e o etinilestradiol são tratamentos promissores para a inibição da espermatogênese e para a produção de peixes estéreis. Esses resultados apresentam potencial serem utilizados na propagação mediada, especialmente em espécies de peixes ameaçadas de extinção. Os resultados acima são inovadores e são aplicáveis para as ciências básicas e para as ciências aplicadas.

Agradecimentos

Os autores são gratos à CTG Brasil (Projeto #PD-00387-0418/2019) pelo incentivo à pesquisa.

Referências

- LÓPEZ, Lucia Suárez. **Transplante interespecífico de espermatogônia tronco de piracanjuba *Brycon orbignyanus***. 2022.
- NÓBREGA, Rafael et al. **Spermatogonial stem cells and their endocrine and paracrine regulation in zebrafish**. 2014. Tese de Doutorado. Utrecht University.

New method to induce sterility in adult fish by oral administration of ethinylestradiol and gestodene using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as model organism

Erika Cruz de OLIVEIRA¹; Giulia Isabelle Ventura Monte RAZO², Larissa FABRICIO³; Gabriella Braga CARVALHO; Lucia Suárez LÓPEZ; George Shigueki YASUI

Faculty of Animal Science and Food Engineering - FZEA/USP School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ)² and Hermínio Ometto Foundation - FHO³

erika.oliveira@usp.br¹; giulia.monterazo@gmail.com²; larissafabricio9@gmail.com³

Objectives

Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) is an endangered Neotropical fish species with a 97% decline of its natural populations, due to overfishing and destruction of natural habitats. In 2013, the species was included in ICMBio's Red List of Threatened species, classified as an Endangered (EN) species A2c.

Given the circumstances above, the aim of this study is to produce sterile recipients of adult yellowtail (*Astyanax altiparanae*), serving as a host for surrogate propagation. Such a procedure, will permit the yellowtail tetra to produce piracanjuba spermatozoa, providing a viable strategy to assist on the recovery of the species.

The oral administration of ethinylestradiol, gestodene and their combination may induce spermatogenesis regression in adult males of yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) to establish an effective recipient for surrogate technologies.

Materials and Methods

All the procedures were conducted using the ethical standards of the Animal Ethics Committee (CEUA) under USP #5450270519 and sampling permission SISBIO #88195-1. A total 300 sexually mature yellowtail tetra males were distributed into twelve 60-L aquariums, with the temperature set at 28°C and a 10% daily partial water change. The experiment was divided into four groups of

aquariums as follows: Control (only basal food); Gestodene (5 mg/ml); Ethinylestradiol (5 mg/ml); Gestodene and Ethinylestradiol (5 mg/ml and 5 mg/ml, respectively). The additives were added to a commercial fish food, and then administrated twice a day, when the food consumption was measured. The treatments were maintained for 30 days. All the treatments were conducted in triplicates. At 15-days intervals, two specimens of each aquarium (i.e. 6 fish per treatment) were euthanized using an overdose of eugenol (300 mg/L) (Biodinâmica, Brazil). Biometric data, such as total length (TL), standard length (SL), total weight (TW), and gonad weight (GW), were measured for each individual to calculate the gonadosomatic index. In addition, collected gonads were processed for subsequent histological observations, using conventional histology techniques, with sections of 5 µm and staining with Hematoxylin and Eosin (HE). The histological sections were observed on the microscope (Nikon-Ni, Tokyo, Japan) and digital images were obtained with a CCD camera (Nikon DSRi2, Nikon, Tokyo, Japan) with the Nis-Ar Elements.

Results

The treatments with gestodene and ethinylestradiol gave better results, with a significant inhibition of spermatogenesis, associated with a possible reabsorption of spermatozoa within the lumen, causing a

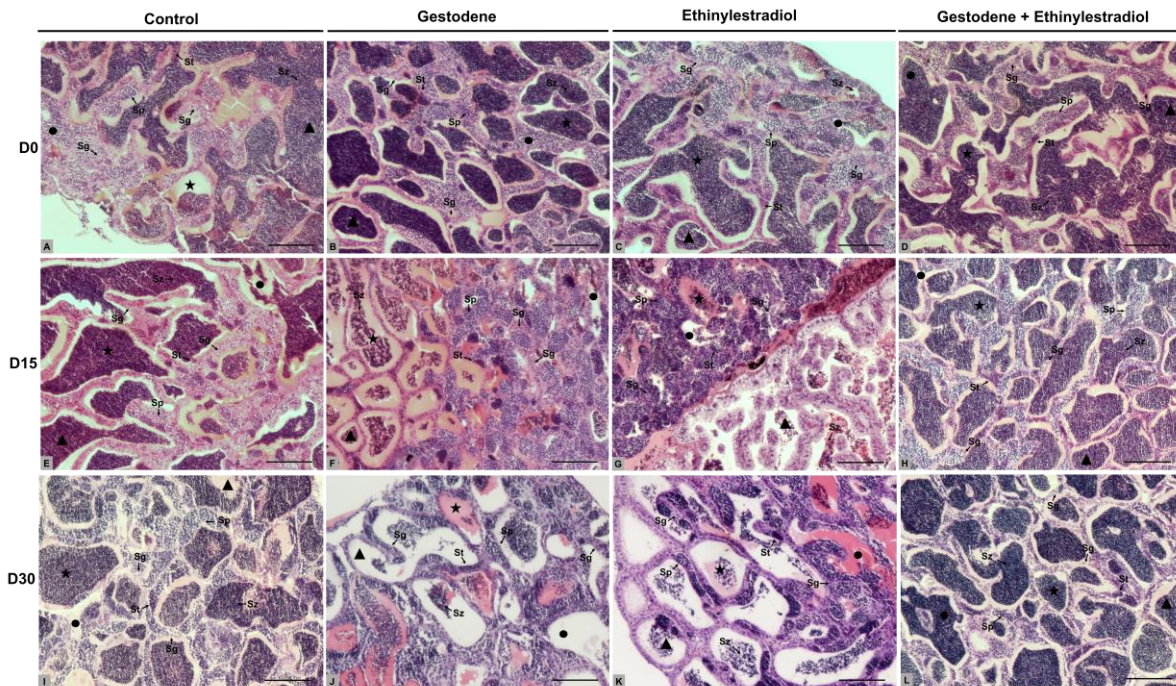


Figure 1. Testis of yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*). D0: first collection of material biology, on July 13, 2023; D15: secondy collection occurred on July 28, 2023; D30: third collection on August 11, 2023. Sg: Spermatogonia; Sp: Spermatocytes; St: Spermatids; Sz: Spermatozoa; ★: Testicular lumen; ●: Cranial/medial portion, with a higher presence of germinal epithelium, spermatogenic lineage; ▲: Medial/caudal portion, with a increased presence of extracellular matrix. Scale: A-L: 200 μ m. Source: Own work.

depletion, as evidenced in Figs. 1F and 1G from D15 and Figs. 1J and 1K from D30. Additionally, differences were observed in different portions of the testis. The caudal region of the testis, in the detached area arrow head, shows increased depletion of spermatozoa. Surprisingly, the combination of both hormones was not effective and did not show any alteration in spermatogenesis, as exemplified in images 1H and 1L from D15 and D30 respectively, indicating similar pattern as control group, in which no hormonal treatment.

Conclusions

Gestodene and ethinylestradiol are promising treatments for spermatogenesis inhibition and produce sterile fish. Those results present potential for surrogate propagation especially regarding endangered fish species. The results above are innovative and are

applicable for both, basic and applied sciences.

Acknowledgements

Authors are grateful to CTG Brasil (Project #PD-00387-0418/2019) for research funding.

References

- CARVALHO, Gabriella Braga. **Production of germinative chimeras in neotropical caraciforms for application in aquaculture and conservation**. 2021. Doctotal thesis. Universidade de São Paulo.
- LÓPEZ, Lucia Suárez. **Interspecific spermatogonial stem cell transplantation in piracanjuba fish *Brycon orbignyanus***. 2022.
- NÓBREGA, Rafael et al. **Spermatogonial stem cells and their endocrine and paracrine regulation in zebrafish**. 2014. Tese de Doutorado. Utrecht University.