



UNESP  
Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”  
Campus de Botucatu



Efeito dos esteroides sexuais no sistema Kisspeptinas e na  
diferenciação gonadal de *Centropomus undecimalis*.

**Juliana Morena Bonita Ricci**

Botucatu, São Paulo  
2020



UNESP  
Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”  
Campus de Botucatu



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

Efeito dos esteroides sexuais no sistema Kisspeptinas e na  
diferenciação gonadal de *Centropomus undecimalis*.

**Juliana Morena Bonita Ricci**

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Doutora no  
Programa de Pós- Graduação em Ciências  
Biológicas (Genética).

**Botucatu, São Paulo**  
**2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ricci, Juliana Morena Bonita.

Efeito dos esteroides sexuais no sistema kisspeptinas e na diferenciação gonadal de *Centropomus undecimalis* / Juliana Morena Bonita Ricci. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rafael Henrique Nóbrega

Coorientador: Eduardo Antônio Sanches

Capes: 20200005

1. Robalo (Peixe). 2. Teleósteos. 3. Diferenciação sexual.  
4. Kisspeptinas.

Palavras-chave: Diferenciação sexual; Protândrico;  
Teleósteos; Transcriptoma.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho ...  
Aos meus avós, José Maria Ricci e Petronília De Mane (*in memoriam*).

## Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega, expresso aqui minha profunda gratidão pela oportunidade de formação no Grupo de Biologia Molecular e Reprodução (RMBG). Receber a sua orientação foi um privilégio e uma honra, seus ensinamentos, entusiasmo e motivação foram cruciais para o meu desenvolvimento. Você sempre será minha fonte de inspiração.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches pelo suporte integral na manutenção dos experimentos e prontidão para ajudar em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manfred Scharl por me receber em seu grupo de pesquisa na Universidade de Würzburgo, Alemanha e colaborar com a realização desta tese. Agradeço também a toda sua equipe, em especial a Profa. Dra. Susanne Kneitz, pela colaboração com as análises de bioinformática e ao Dr. Mateus Contar Adolphi por todos os ensinamentos e suporte, fazer parte deste grupo de pesquisa foi muito enriquecedor e gratificante.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, por todo suporte e infraestrutura oferecidos para que eu pudesse desenvolver obter a formação do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros anos de doutorado e pela bolsa do Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE).

À FAPESP pela Bolsa de doutorado no país (2018/16595-7) e Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior (2019/19874-7) concedidas.

Ao Dr. Bruno Francelino de Melo e ao Dr. Rafael Takajiro Nakajima pelas colaborações nas análises filogenéticas.

À Dr. Cristina Vaz Avelar Carvalho por todos os seus ensinamentos e experiência compartilhados sobre o manejo dos *Centropomus undecimalis*.

Aos professores, Dr. Claudio de Oliveira, Dr. Fausto Foresti, Dr. César Martins, Dr. Danillo Pinhal, Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto pela assistência técnica e estrutural e aos técnicos, José Eduardo, Keila Emílio e Ricardo por todo o suporte oferecido.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Gustavo Manuel Somoza, Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus, Profa. Dr. Talita Sarah Mazzoni e Profa. Dra. Arielle Cristina Arena por aceitarem o convite para avaliar a presente tese.

Aos amigos de laboratório, foi um prazer imensurável trabalhar com vocês, Maira, Lucas, Ivana, Daniel, Viviane, Marcos, Anabel, Emanuel, Vinícius, Armando, Isabela, Beatriz, Camila, Jéssica, José, Fernando e em especial a Melanie, Giovana e Aldo que deram suporte neste trabalho.

A Francisca Maria Grandchamp, uma pessoa muito especial.

Ao querido amigo Dr. Arno Juliano Butzge pelas contribuições nas coletas e por todo o período que trabalhamos juntos.

Ao Laboratório Nacional de Aquicultura Marinha (LANAM), coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches, e aos membros Mariana Molica Silveira, Jade Marcel Alves Aprigio, Keila Nazaré Araújo, Arthur Artemtchonque, Ricácio Luan Marques Gomes e Bruno dos Santos Sosa que cuidaram do manejo dos animais com muita dedicação.

À minha família, Edison, Solange, Eduardo e Marcela por todo o suporte e apoio.  
Deixo aqui minha gratidão e respeito a cada *Centropomus undecimalis* utilizado  
nesta pesquisa ♥.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ARC** - Núcleo arqueado

**AVPV** - Núcleo paraventricular anteroventral

**cDNA** - DNA complementar

**dNTP** - Deseoxirribonucleotídeos

**E2** - 17 $\beta$ -Estradiol

**Fsh** - Hormônio folículo-estimulante

**GDEs** – Genes diferencialmente expressos

**GnRH** - Hormônio liberador de gonadotropinas

**GO** - Ontologia Gênica (do inglês, Gene ontology)

**GPR54** - Receptor acoplado a proteína G-54

**GPR54** *-/- Knockout* do gene *GPR54*

**HHG** - Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

**KEGG** - Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto

**kiss1R** - Receptor de kisspeptina

**LH** - Hormônio luteinizante

**MT**- 17 $\alpha$ -Metiltestosterona

**POA** - Área pré-óptica

**RNA<sub>m</sub>** - RNA mensageiro

**RT-PCR** - Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

**RT-qPCR** - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

**NCBI** - *National Center for Biotechnology and Information*

**pbs** - pares de base

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**RNA-seq** - Sequenciamento do RNA (do inglês, RNA sequencing)

## RESUMO

O robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) é um peixe hermafrodita protândrico de grande importância econômica. Um dos principais entraves na sua produção consiste na obtenção de matrizes fêmeas em cativeiro. Como alternativa, realiza-se captura de fêmeas selvagens ou induz a inversão sexual utilizando esteroides sexuais. No entanto, pouco se sabe sobre as informações genéticas relacionadas à reprodução e diferenciação sexual nesta espécie. Diante deste cenário, neste estudo procuramos entender o efeito dos esteroides sexuais no eixo reprodutivo durante a diferenciação gonadal. Para isto, analisamos a expressão da kisspeptina encefálica, a morfologia gonadal e os perfis transcriptômicos (RNA-seq) das gônadas pós-tratamento com esteroides. Para tanto, 450 animais indiferenciados foram divididos em 3 grupos os quais receberam dieta basal (controle), suplementada com 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT) ou suplementada com 17 $\beta$ -estradiol (E2) por 45 dias. Os encéfalos e as gônadas dos animais foram coletados logo após o tratamento hormonal e em intervalos de 4 meses durante o período de 1 ano. Os resultados da expressão gênica dos encéfalos mostraram que os grupos tratados com MT e E2 apresentaram aumento nos níveis de RNAm de *kiss1* em relação ao controle. Os transcritos primários do receptor *kissr2* não variaram entre os tratamentos. Quanto à morfologia, o grupo tratado com MT apresentou gônada mais desenvolvida e com características morfológicas de testículo. O grupo E2 também apresentou gônada mais desenvolvida, porém com características morfológicas de ovário. Para análise do RNA-seq foi adotada a estratégia *de novo*. A montagem do transcriptoma gerou 45579 transcritos com uma taxa de completude 85,6% e de mapeamento de 67%. Foram identificados genes diferencialmente expressos (GDEs) entre os tratamentos, dentre eles alguns relacionados a diferenciação sexual, incluindo os genes pró-testículo (*nr5a2*, *tbx1*, *dmrt3*, *ptch3*, *ptch2*, *shh*, etc) no grupo MT, e no grupo E2 os GDEs pró-ovário (*cyp19a1*, *foxl2*, *irx5*, *wnt4a*, *rspo1*, *fst*, etc). Nossos resultados até o presente momento sugerem que os neurônios *kiss1* são sensíveis a ação dos esteroides sexuais. O tratamento com MT estimulou o desenvolvimento testicular, por outro lado o E2 parece ter invertido o destino da diferenciação sexual das gônadas, resultando em um ovário no início do desenvolvimento. Por fim, o transcriptoma *de novo* das gônadas gerado aqui resultou em um recurso genômico valioso para a triagem de vias e genes potenciais envolvidos na diferenciação sexual de *C. undecimalis*.

## ABSTRACT

The common snook (*Centropomus undecimalis*) is a protandric hermaphrodite fish of high economic importance. One of the main bottlenecks in the production of common snook consists in obtaining the captive females. As an alternative, wild females are captured or sex reversed by using sex steroids. However, little is known about the genetic information related to reproduction and sex differentiation in this species. Based on this scenario, this thesis aims to unravel the effects of sex steroids on the reproductive axis during gonadal differentiation. For this, we analyzed the expression of brain kisspeptin, gonadal morphology, and transcriptomic profiles (RNA-seq) of gonads after steroid treatment. For this purpose, 450 undifferentiated animals were divided into 3 groups which received a basal diet (control), supplemented with 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) or supplemented with 17 $\beta$ -estradiol (E2) for 45 days. The encephalon and gonads were collected immediately after hormonal treatment and at 4-month intervals during 1 year. The results revealed that MT and E2 increased brain kiss1 mRNA levels compared to control. kissr2 receptor transcripts did not vary between treatments. As regards to the morphology, the group treated with MT showed an advanced gonadal development with morphological features of a testis. The group that received E2 also had more developed gonads, but with morphological characteristics of the ovary. RNA-seq analysis was performed using de novo transcriptome of *C. undecimalis*. The assembly of the transcriptome generated 45,579 transcripts with a complete ratio of 85.6% and a mapping rate of 67%. Differentially expressed genes (DEGs) were identified between treatments, some related to sex differentiation, including the pro-testis genes (*nr5a2*, *tbx1*, *dmrt3*, *ptch3*, *ptch2*, *shh*, etc.) in the MT group and the E2 group the pro-ovarian DEGs (*cyp19a1*, *foxl2*, *irx5*, *wnt4a*, *rspo1*, *fst*, etc). Our results suggested that *kiss1* neurons are sensitive to the action of sex steroids. Treatment with MT stimulated testicular development, on the other hand, E2 seems to have reversed the fate of sex differentiation of the gonads, resulting in an ovary at the beginning of development. Finally, de novo gonadal transcriptome in the thesis has resulted in a valuable genomic resource for screening potential pathways and genes involved in the sexual differentiation of *C. undecimalis*.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                         | <b>8</b>  |
| 1.1. KISSPEPTINAS NOS TELEÓSTEOS .....                                                                                             | 14        |
| 1.2. DIFERENCIAÇÃO SEXUAL .....                                                                                                    | 16        |
| 1.3. DIFERENCIAÇÃO MASCULINA .....                                                                                                 | 17        |
| 1.4. DIFERENCIAÇÃO OVARIANA .....                                                                                                  | 19        |
| <b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>                                                                                                      | <b>21</b> |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>                                                                                                          | <b>22</b> |
| 3.1. GERAL .....                                                                                                                   | 22        |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                                   | 22        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                 | <b>22</b> |
| 4.1. ANIMAIS .....                                                                                                                 | 22        |
| 4.2. DESENHO DOS PRIMERS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAIS DOS CDNAS DAS<br>KISSPEPTINAS E SEUS RECEPTORES EM <i>C. UNDECIMALIS</i> .....  | 23        |
| 4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....                                                                                               | 24        |
| 4.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA .....                                                                                                    | 26        |
| 4.5. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA: QRT-PCR .....                                                                                   | 26        |
| 4.6. ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....                                                                                                   | 27        |
| 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                                                                     | 28        |
| 4.8. MONTAGEM 'DE NOVO' E ANOTAÇÃO FUNCIONAL DO TRANSCRIPTOMA .....                                                                | 29        |
| 4.9. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (GDEs) .....                                                               | 30        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>                                                                                                         | <b>31</b> |
| 5.1. ANÁLISES FILOGENÉTICAS DAS SEQUENCIAS PARCIAIS DO cDNA DA KISS1,<br>KISSR2 E KISSR3 DE <i>CENTROPOMUS UNDECIMALIS</i> . ..... | 31        |
| 5.2. EXPRESSÃO GÊNICA (QRT-PCR) .....                                                                                              | 34        |
| 5.3. ANÁLISES MORFOLÓGICAS .....                                                                                                   | 35        |
| 5.3.1. Grupo A1 .....                                                                                                              | 36        |
| 5.3.2. Grupo A2 .....                                                                                                              | 37        |
| 5.3.3. Grupo A3 .....                                                                                                              | 39        |
| 5.4. TRANSCRIPTOMA E MONTAGEM DE NOVO .....                                                                                        | 41        |
| 5.5. ANÁLISE DOS GDEs E DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL .....                                                                          | 42        |
| 5.6. ANÁLISE DO GDEs EM RESPOSTA AO TRATAMENTO E2 .....                                                                            | 48        |
| 5.7. ANÁLISE DO GDEs EM RESPOSTA AO TRATAMENTO MT .....                                                                            | 49        |
| 5.8. GDEs ENTE O GRUPO TRATADO COM MT VS GRUPO TRATADO COM E2 .....                                                                | 50        |
| 5.9. VISÃO GLOBAL DOS GENES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL E<br>GAMETOGENESE .....                                             | 52        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                          | <b>54</b> |
| 6.1. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA .....                                                                                                | 57        |
| 6.2. ESTRADIOL (E2) ATIVA GENES DA VIA DE DIFERENCIAÇÃO FEMININA .....                                                             | 57        |
| 6.3. METILTESTOSTERONA ATIVA GENES PRÓ-MACHOS .....                                                                                | 61        |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                          | <b>65</b> |

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>8. REFERÊNCIAS .....</b> | <b>66</b> |
|-----------------------------|-----------|

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os vertebrados, os peixes teleósteos são os que apresentam maior plasticidade sexual, conferindo a alguns exemplares a capacidade de mudar de sexo em determinados períodos da vida de forma natural ou induzida (LE PAGE; DIOTEL; VAILLANT; PELLEGRINI *et al.*, 2010; PIFERRER, 2001). Em relação aos mecanismos reprodutivos, a maioria das espécies de peixes é gonocórica, isto é, após a determinação sexual, as gônadas são diferenciadas em ovário ou testículo, com o sexo gonadal permanecendo fixo por todo o ciclo de vida (KOBAYASHI; NAGAHAMA; NAKAMURA, 2013). Além do gonocorismo, os peixes podem ser hermafroditas simultâneos, ou seja, o tecido gonadal feminino e masculino estão presentes simultaneamente, mas não necessariamente com produção de gametas. Já os hermafroditas sequenciais apresentam o desenvolvimento de tecido gonadal masculino e feminino em momentos distintos, neste caso, a produção dos gametas masculinos e femininos não ocorre simultaneamente, mas sim após um processo de inversão de sexo natural (KOBAYASHI *et al.*, 2013). Os hermafroditas sequenciais são classificados como: protândricos (indivíduos têm a primeira maturação sexual como machos e depois invertem para fêmeas) ou protogínicos (indivíduos atingem a primeira maturação sexual como fêmeas e depois invertem para machos); e mais raramente os monossexuais: as populações são compostas exclusivamente de fêmeas ginogenéticas (BAROILLER; GUIGUEN; FOSTIER, 1999); (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Além disso, os teleósteos apresentam diferentes formas de determinação e diferenciação sexual (PIFERRER, 2001). A determinação do sexo pode ser (1) genética, na qual há herança de um gene master presente no cromossomo sexual, que pode ser monofatorial (XX/XY ou ZZ/ZW) ou polifatorial, em que a soma de vários *loci* independente determina o fenótipo sexual (KOBAYASHI; NAGAHAMA;

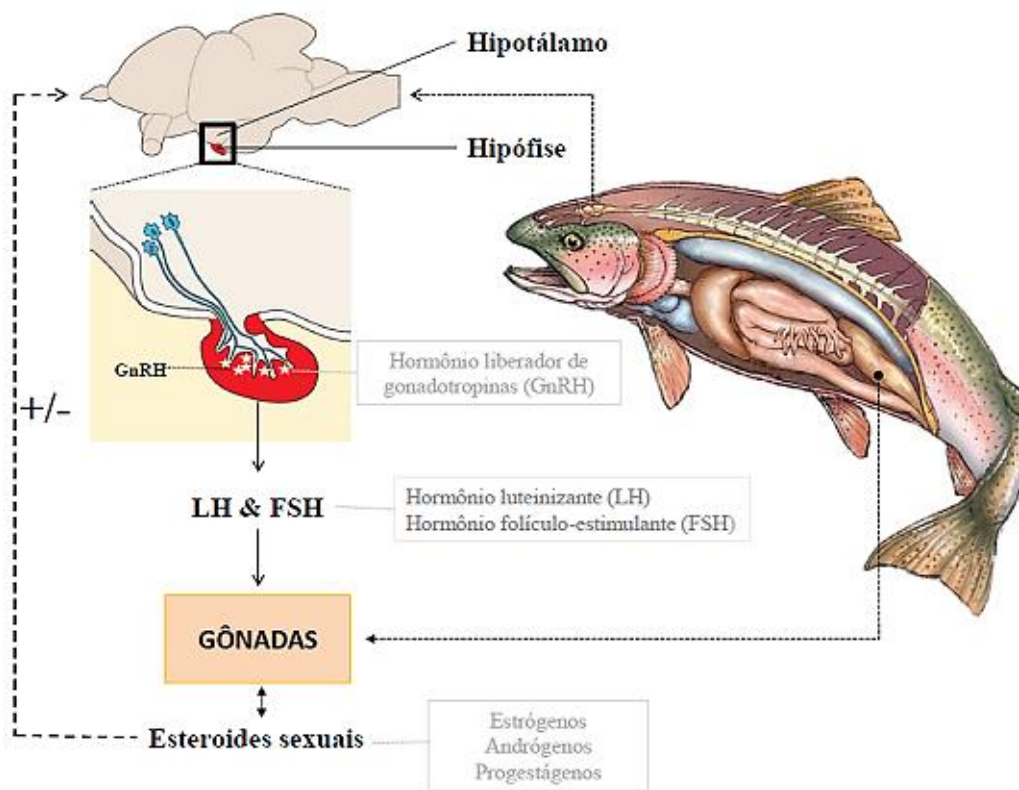
NAKAMURA, 2013; SCHARTL, 2004), e/ou (2) ambiental, fatores abióticos (temperatura da água, pH) ou bióticos (densidade populacional) podem determinar/diferenciar o sexo (BAROILLER; D'COTTA; SAILLANT, 2009).

Independentemente do sexo genético e/ou ambiental, em várias espécies de teleósteos é possível alterar a via da diferenciação sexual durante determinados períodos do desenvolvimento através do uso de esteroides sexuais (BAROILLER; D'COTTA, 2016; SINGH, 2013).

Na aquicultura, a utilização dos esteroides sexuais exógenos tem como principal finalidade o controle da taxa de sexo da população (LEET; GALL; SEPÚLVEDA, 2011). Um dos andrógenos mais utilizados é o  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT). Estudo recente em *C. undecimalis* mostrou que é possível acelerar o início da espermatogênese administrando MT (PASSINI; STERZELECKI; DE CARVALHO; BALOI *et al.*, 2018). Assim como é possível promover inversão sexual em espécies gonocorísticas (KITANO; TAKAMUNE; NAGAHAMA; ABE, 2000), acelerar a mudança de sexo feminino para masculino em espécies hermafroditas protogínicas (SARTER; PAPADAKI; ZANUY; MYLONAS, 2006) ou até mesmo induzir machos primários nessas espécies (LEE; HUR; NA; BAEK *et al.*, 2014). Similarmente, os estrógenos tem sido utilizados para feminização de espécies gonocorísticas (PIFERRER, 2001) e protândricas, por exemplo *C. undecimalis* e *Amphirion ocellaris* (PHUC THUONG; SUNG; AMBAK; ABOLMUNAFI, 2017).

Os efeitos desses tratamentos hormonais ocorrem de forma sistêmica, o que significa que eles podem influenciar o eixo reprodutivo. Como nos vertebrados, o sistema reprodutivo dos peixes é regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Figura 1) (WELTZIEN *et al.*, 2004). No hipotálamo estão presentes os neurônios que secretam GnRH (hormônio liberador de gonadotropina) os quais possuem projeções que os

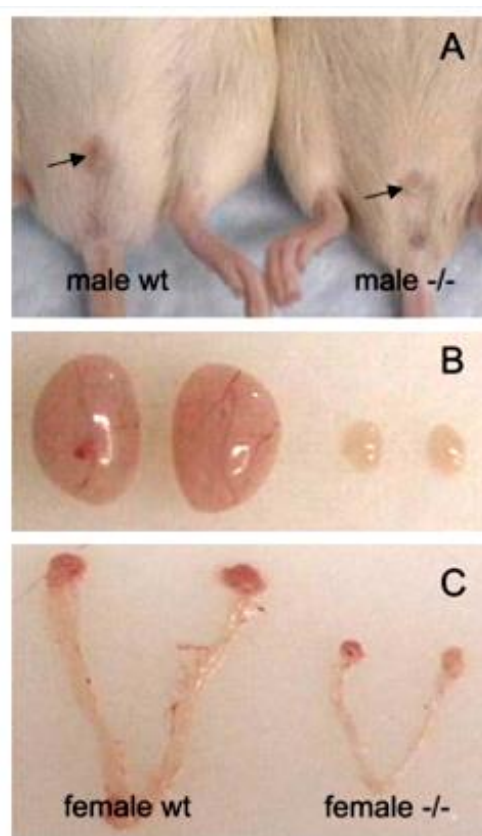
conectam diretamente à glândula hipófise. Na hipófise, o GnRH estimula as células gonadotróficas, células produtoras do hormônio folículo estimulante (Fsh) e hormônio luteinizante (Lh), na síntese e secreção das gonadotropinas (Fsh e Lh) (ZOHAR *et al.*, 2010). As gonadotropinas através da corrente sanguínea chegam até as gônadas e estimulam a produção dos esteroides sexuais (andrógenos, estrógenos e progestágenos), que por sua vez controlam a gametogênese e atuam no eixo-hipotalâmico-hipofisário através de um mecanismo de retroalimentação estimulatório (*feedback* positivo) ou inibitório (*feedback* negativo) (ZOHAR *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em peixes teleósteos. Neurônios hipotalâmicos secretores de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) inervam diretamente a hipófise (vermelho). O GnRH estimula a síntese e liberação das gonadotropinas, hormônio folículo estimulante (Fsh) e hormônio luteinizante (Lh). O Fsh e o Lh liberados pela hipófise serão transportados via corrente sanguínea até as gônadas e estimularão a síntese e a liberação dos hormônios esteroides. Os hormônios esteroides através de um mecanismo retroalimentação (positiva/negativa) atuam na regulação do eixo. Adaptado de Maruska & Fernald (2011).

Um outro peptídeo que atua no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é a kisspeptina. Inicialmente descoberta em mamíferos como um supressor de metástase, a Kisspeptina é um peptídeo codificado pelo gene *KISS1* (LEE; MIELE; HICKS; PHILLIPS et al., 1996), o qual se liga ao receptor acoplado a proteína G, GPR54 ou *KISSR1* (KOTANI; DETHEUX; VANDENBOGAERDE; COMMUNI et al., 2001).

A primeira evidência do papel da kisspeptina relacionada à reprodução foi encontrada em membros de uma família portadores do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI), condição caracterizada por uma deficiência na secreção das gonadotropinas (FSH e LH), resultado de uma mutação no receptor GPR54 (DE ROUX; GENIN; CAREL; MATSUDA et al., 2003). Semelhantemente, modelos murinos *knockout* para o receptor da kisspeptina (*GPR54*<sup>-/-</sup>) de ambos os sexos apresentaram anormalidades no desenvolvimento sexual como hipodesenvolvimento dos caracteres sexuais (Figura 2) e baixos níveis plasmáticos de gonadotropinas que foram reestabelecidos quando administrado GnRH análogo (FUNES; HEDRICK; VASSILEVA; MARKOWITZ et al., 2003; SEMINARA; MESSENGER; CHATZIDAKI; THRESHER et al., 2003).



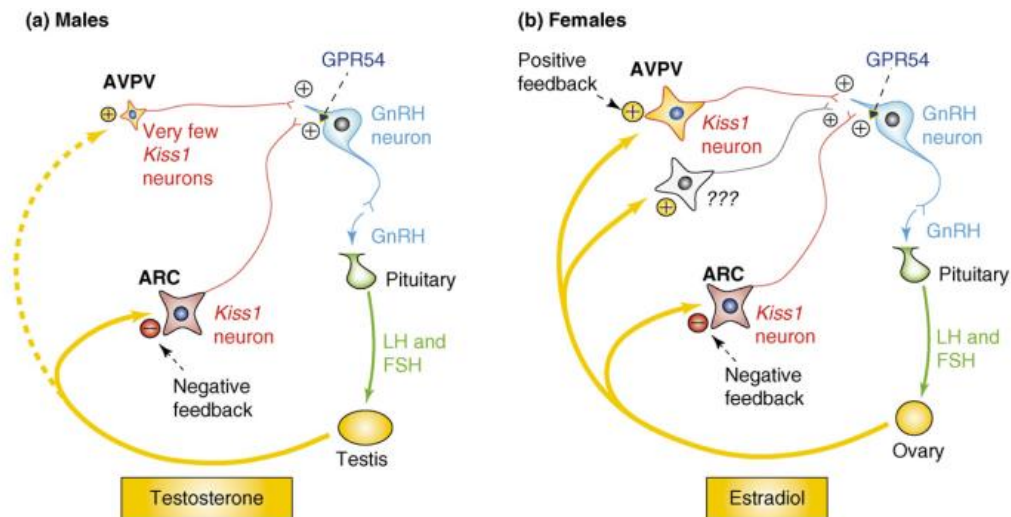
**Figura 2.** Análise macroscópica de ratos machos e fêmeas selvagens e GPR54 <sup>-/-</sup>, com 30 dias de idade. (A) Visualização externa de macho selvagem e GPR54<sup>-/-</sup>, mostrando pênis de tamanho reduzido. (B) Testículo reduzido de macho GPR54<sup>-/-</sup> comparado ao macho selvagem. (C) Cornos uterinos e ovários reduzidos de fêmea homozigota comparados a fêmea selvagem. Retirado de Funes *et al.*, (2003).

Por outro lado, a administração de kisspeptina resultou no desenvolvimento precoce dos caracteres sexuais em camundongos fêmeas (NAVARRO; CASTELLANO; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; BARREIRO *et al.*, 2004), elevação nos níveis plasmáticos de FSH e/ou LH em outros mamíferos (MATSUI; TAKATSU; KUMANO; MATSUMOTO *et al.*, 2004); (MAGEE; FORADORI; BRUEMMER; ARREGUIN-AREVALO *et al.*, 2009; MESSENGER; CHATZIDAKI; MA; HENDRICK *et al.*, 2005). Este efeito estimulatório da kisspeptina no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é inibido na presença de um antagonista do GnRH, sugerindo assim, a atuação das kisspeptinas na secreção de gonadotropinas via ativação dos neurônios GnRH (MATSUI; TAKATSU; KUMANO; MATSUMOTO *et al.*, 2004). Essa via de atuação foi comprovada através da identificação dos receptores GPR54 nos neurônios GnRH e do

aumento dos níveis plasmáticos de GnRH após a administração do peptídeo kisspeptina (MESSAGER *et al.*, 2005). Na maioria dos mamíferos, os neurônios kisspeptinérgicos *KISS1* estão localizados majoritariamente nos núcleos anteroventral periventricular (AVPV) e no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo (LEHMAN; MERKLEY; COOLEN; GOODMAN, 2010)

Em mamíferos, a regulação das kisspeptinas ocorre via esteroides sexuais (REF). Efeitos estimulatório ou inibitório dos esteroides sexuais via *kiss* foi validado pela presença de receptores de andrógenos e estrógenos nos neurônios kisspeptinérgicos em camundongos (KAUFFMAN; PARK; MCPHIE-LALMANSINGH; GOTTSCH *et al.*, 2007; SMITH; DUNGAN; STOLL; GOTTSCH *et al.*, 2005). Porém, a regulação dos esteroides difere entre neurônios do núcleo AVPV e do núcleo ARC do hipotálamo de roedores (Figura 3) (KAUFFMAN; PARK; MCPHIE-LALMANSINGH; GOTTSCH *et al.*, 2007)

Para avaliar a ação dos esteroides, ratos (IRWIG; FRALEY; SMITH; ACOHIDO *et al.*, 2004; SMITH; CUNNINGHAM; RISSMAN; CLIFTON *et al.*, 2005) e macacos (SHIBATA; FRIEDMAN; RAMASWAMY; PLANT, 2007) foram castrados e o resultado observado foi um aumento na expressão do RNAm *KISS-1* no ARC do hipotálamo. Por outro lado, quando administrado hormônios esteroides, testosterona ou estradiol, a expressão diminui. Esses dados sugerem que os neurônios *KISS1* do ARC desempenham um papel ativo na regulação do feedback negativo GnRH. Já a população de neurônios kisspeptinérgicos localizados no AVPV apresentam aumento da expressão na presença dos esteroides sexuais e uma redução na ausência, atuando como um feedback positivo nos hormônios secretores de GnRH (SMITH; CLIFTON; STEINER, 2006; SMITH; CUNNINGHAM; RISSMAN; CLIFTON *et al.*, 2005; SMITH; LI; PEREIRA; CLARKE, 2009).



**Figura 3.** Modelo de sinalização da via kisspeptina no encéfalo de roedores, (a) macho e (b) fêmea. Neurônios do núcleo arqueado (ARC) são negativamente regulados por esteroides sexuais gonadais [Testosterona (a) e Estradiol (b)]. Neurônios do núcleo anteroventral periventricular (AVPV) são positivamente regulados pelos esteroides sexuais gonadais [Testosterona (a) e Estradiol (b)]. Retirado de Kauffman *et al.*, (2007).

### 1.1. Kisspeptinas nos teleósteos

Para mamíferos eutérios somente uma cópia do gene *KISS1* foi descrito, mas estudos em outros vertebrados revelaram a existência de três genes parálogos para o ligante *kiss* (*kiss1*, *kiss2* e *kiss3*) (PASQUIER; LAFONT; TOSTIVINT; VAUDRY *et al.*, 2012). A origem desses genes parálogos é atribuída a uma hipótese filogenética baseada em uma análise de sintenia, onde o gene teve sua origem de um único ancestral e foi duplicado durante o evento denominado duplicação genômica, 1R e 2R, no início da evolução dos vertebrados (PASQUIER *et al.*, 2012a, 2012b, 2014). Na maioria das espécies de teleósteos, o sistema kisspeptina é composto por dois ligantes e dois receptores (BIRAN *et al.*, 2008; KITAHASHI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2009; OHGA *et al.*, 2013; SELVARAJ *et al.*, 2010; ZMORA *et al.*, 2012;).

Em outros vertebrados já foram descritas até quatro cópias dos genes parálogos para o receptor da kisspeptina (*kissr1*, *Kissr2*, *Kissr3* e *Kissr4*) (PASQUIER; LAFONT;

TOSTIVINT; VAUDRY *et al.*, 2012). Todos os teleósteos estudados até o momento possuem o gene *kissr2* (TENA-SEMPERE; FELIP; GÓMEZ; ZANUY *et al.*, 2012) e algumas espécies apresentam o gene *kissr3* como zebrafish (*Danio rerio*) (BIRAN; BENDOR; LEVAVI-SIVAN, 2008), goldfish (*Carassius auratus*) (LI; ZHANG; LIU; HUANG *et al.*, 2009), medaka (*Oryzias latipes*) (Lee *et al.* 2009), robalo-riscado (*Morone saxatilis*) (ZMORA; STUBBLEFIELD; WONG; LEVAVI-SIVAN *et al.*, 2015), cavala (*Scomber japonicus*) (OHGA; FUJINAGA; SELVARAJ; KITANO *et al.*, 2013) e enguia europeia (*Anguilla anguilla*) (PASQUIER; LAFONT; JENG; MORINI *et al.*, 2012).

Ainda em teleósteos, linhagens transgênicas de zebrafish que expressam mCherry (fluoróforo vermelho) sob controle do promotor *kiss1* (*kiss1:mCherry*) foram identificadas no complexo habenular, assim como em medaka, (*O. latipes*) e goldfish, (*C. auratus*) (SERVILI; LE PAGE; LEPRINCE; CARATY *et al.*, 2011). Já neurônios que expressam *kiss2* (*kiss2:mCherry*) foram localizados no hipotálamo, telencéfalo, mesencéfalo, área pré-óptica do tálamo e projeções no bulbo olfatório de zebrafish (SONG *et al.*, 2014).

Assim como em mamíferos, nos teleósteos foi descrita a ação dos hormônios esteroides na regulação do sistema *kiss* (ALVARADO; SERVILI; MOLÉS; GUEGUEN *et al.*, 2016; MIGAUD; ISMAIL; COWAN; DAVIE, 2012). Porém, devido as diferentes localizações dos neurônios kisspeptinérgicos e a presença de dois ligantes e dois receptores para *kiss*, ainda não estão estabelecidos quais são estimulados ou inibidos por esteroides. Por exemplo, estrógeno ovariano regula positivamente neurônios *kiss1* do núcleo ventral tuberis em medaka (KANDA; AKAZOME; MATSUNAGA; YAMAMOTO *et al.*, 2008; MITANI; KANDA; AKAZOME; ZEMPO *et al.*, 2010), da área pré-óptica em goldfish (*C. auratus*) (KANDA; KARIGO; OKA, 2012) e do

hipotálamo ventral em zebrafish (*D. rerio*) (SERVILI; LE PAGE; LEPRINCE; CARATY et al., 2011). Por outro lado, em sea bass (*Dicentrarchus labrax*), os esteroides sexuais não alteram os níveis de expressão do *kiss1* (ALVARADO; SERVILI; MOLÉS; GUEGUEN et al., 2016).

### 1.2. Diferenciação sexual

O processo de diferenciação sexual ocorre quando a gônada indiferenciada bipotencial se diferencia em um testículo ou um ovário. Este processo inicia-se pela ativação de vias de sinalização sexo-específico que resultam em efetores masculinos ou femininos (HERPIN; SCHARTL, 2015). No início do desenvolvimento gonadal, a gônada indiferenciada é composta por células somáticas e células germinativas primordiais (PGCs) (BRAAT; SPEKSNIJDER; ZIVKOVIC, 1999).

Em mamíferos, a gônada indiferenciada é caracterizada pela expressão dos genes, *Sf1* (*Steroidogenic factor 1*), também denominado *Nr5a1* ou *Ad4bp*, (HATANO; TAKAKUSU; NOMURA; MOROHASHI, 1996), *Wt1* (*Wilms' tumor 1 protein*) (VIDAL; SCHEDL, 2000) *Gata4* (*GATA Binding Protein 4*). Além desses genes, vias de sinalização estão atuando no desenvolvimento gonadal inicial, como os componentes da via Wnt (*Wingless-type MMTV integration site Family*), *Wnt4* (*Wnt Family Member 4*) e *Rspo1* (*R-Spondin 1*), são expressos durante a proliferação de células somáticas em ambos os sexos (CHASSOT; BRADFORD; AUGUSTE; GREGOIRE et al., 2012). Assim como a ativação da via de sinalização da insulina através dos receptores *Insr* e *Igf1r* (PITETTI; CALVEL; ROMERO; CONNE et al., 2013).

Após o estabelecimento das PGCs na região da futura gônada, inicia-se o processo de proliferação marcada pela expressão do *Fgf4* e *Fgf8* (KAWASE; HASHIMOTO; PEDERSEN, 2004). Em seguida, a linhagem germinativa masculina entra em parada

mitótica enquanto a linhagem germinativa feminina entra na primeira prófase meiótica. A entrada em meiose é marcada pela expressão do gene *Stra8* (*Stimulated by Retinoic Acid gene 8*), sendo o primeiro sinal de dimorfismo gonadal. O ácido Retinóico, sintetizado pela enzima ALDH1A2, se liga ao receptor de ácido retinóico (RAR) e induz a expressão de *Stra8* nas células germinativas desencadeando a meiose (BOWLES; KOOPMAN, 2007). Nos machos, as células de Sertoli produzem uma enzima, CYP26B1, que degrada o ácido retinoico retardando a entrada da meiose das células germinativas masculinas (BOWLES; KNIGHT; SMITH; WILHELM *et al.*, 2006).

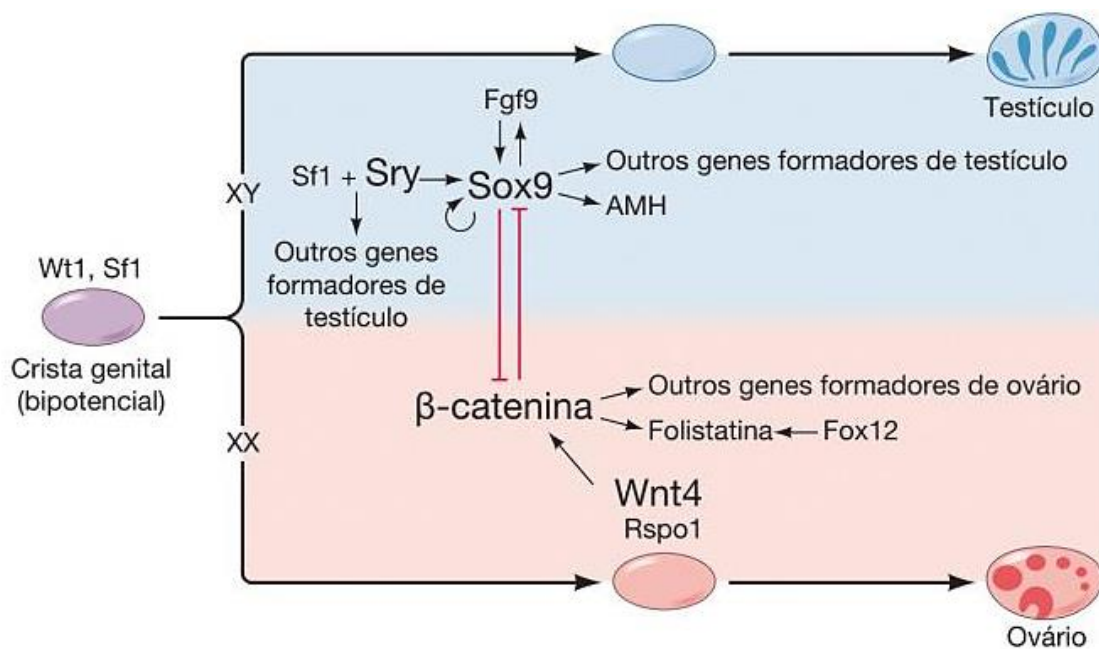
Assim como nos mamíferos, a via do ácido retinoico mostrou-se importante para a espécie de peixe *Siluris meridionalis* (LI; FENG; MA; DONG *et al.*, 2016) porém, para medaka e tilápia apesar da via ser importante na indução da meiose, não houve relação com a entrada da primeira meiose nas fêmeas (ADOLFI; HERPIN; REGENSBURGER; SACQUEGNO *et al.*, 2016; FENG; FANG; CHENG; HE *et al.*, 2015).

As células germinativas femininas avançam para a primeira prófase meiótica antes de parar no estágio de diplóteno (SPEED, 1982). Em contraste, as células germinativas masculinas entrarão em meiose tardiamente, nesse período genes como o *Pou5f1* (POU Domain, Class 5, Transcription Factor 1), também chamado de OCT3 / 4), *Nanos2*, assim como a via de sinalização TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*) estarão atuando na prevenção da meiose e quiêscencia das células germinativas (BARRIOS; FILIPPONI; PELLEGRINI; PARONETTO *et al.*, 2010; MORENO; ATTALI; ALLEMAND; MESSIAEN *et al.*, 2010; TSUDA; SASAOKA; KISO; ABE *et al.*, 2003).

### 1.3. Diferenciação masculina

Em mamíferos XY, o gene determinante do sexo masculino *Sry* (*Sex Determining Region Y*) (KOOPMAN; GUBBAY; VIVIAN; GOODFELLOW *et al.*, 1991) atua em

conjunto com *Sf-1* regulando positivamente a transcrição do *Sox9* (*SRY-Box Transcription Factor 9*) nas células somáticas bipotentes que se diferenciara em células de Sertoli (Figura 4) (SEKIDO; LOVELL-BADGE, 2008). Enquanto a expressão do *Sry* é transitória, a expressão do *Sox9* nas células de Sertoli é contínua (SEKIDO; BAR; NARVÁEZ; PENNY *et al.*, 2004). A manutenção da expressão *Sox9* é mantida por dois mecanismos de *feedback* positivo, um envolve *Fgf9* e o receptor *Fgfr2*, e o outro a via de sinalização *Ptgds* (prostaglandina D sintase) (KIM; BINGHAM; SEKIDO; PARKER *et al.*, 2007; KIM; KOBAYASHI; SEKIDO; DINAPOLI *et al.*, 2006; WILHELM; MARTINSON; BRADFORD; WILSON *et al.*, 2005). Além de manter a expressão do *Sox9*, o *Fgf9* atua inibindo o *Wnt4*, gene relacionado à diferenciação gonadal feminina, (KIM; KOBAYASHI; SEKIDO; DINAPOLI *et al.*, 2006) .



**Figura 4.** Mecanismos moleculares da diferenciação sexual em mamíferos. Retirado de Scott F. Gilbert *et al.*, (2007).

Nos teleósteos, o *sox9b* é expresso nas células somáticas da gônada bipotencial de ambos os sexos, diferindo da especificidade encontrada nos mamíferos para esse gene

(NAKAMURA; AOKI; SAITO; KUROKI *et al.*, 2008). É proposto que o *sox9b* atua em conjunto com o *dmrt1* na especificação das células de Sertoli em medaka (NAKAMURA; AOKI; SAITO; KUROKI *et al.*, 2008). O *dmrt1* (*doublesex- and mab-3-related transcription factor 1*) é um fator de transcrição conservado que desempenha importante papel durante a determinação e diferenciação sexual dos vertebrados (HERPIN; SCHARTL, 2015).

Em mamíferos, a diferenciação das células de Leydig ocorre através da via de sinalização *Hedgehog* (YAO; WHORISKEY; CAPEL, 2002). A via *Hedgehog* é fundamental na diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário (VARJOSALO; TAIPALE, 2008). Em mamíferos, a via é composta por três ligantes homólogos *Hedgehog* (*Hh*), *Desert* (*DHh*), *Indian* (*IHh*) e *Sonic* (*SHh*), dois receptores *Patched 1* e *2* e por três fatores de transcrição GLI 1, 2 e 3 (VARJOSALO; TAIPALE, 2008). A diferenciação da célula de Leydig ocorre via sinalização parácrina da proteína extracelular DHH secretada pelas células de Sertoli, que se liga no receptor *Patched 1* liberando as proteínas GLI que atuam como ativador transcricional (YAO; WHORISKEY; CAPEL, 2002); (CLARK; GARLAND; RUSSELL, 2000).

#### 1.4. Diferenciação ovariana

Nas gônadas XX em mamíferos, a diferenciação do ovário é dirigida principalmente pela via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina assim como pelo fator de transcrição *Foxl2* (*Forkhead box L2*). Como mencionado no tópico acima, *Wnt4* e *Rspo1* são inicialmente expressos nas células somáticas das cristas genitais dos indivíduos de ambos os sexos, porém quando inicia o processo de diferenciação sexual a expressão de *Wnt4* é regulada negativamente na gônada masculina e mantida na gônada feminina (VAINIO; HEIKKILÄ; KISPERT; CHIN *et al.*, 1999). *Wnt4* e *Rspo1*, por meio da via

Wnt canônica, atuam na estabilização e translocação nuclear de  $\beta$ -catenina (Figura 4) (PARMA; RADI; VIDAL; CHABOISSIER *et al.*, 2006). A  $\beta$ -catenina é fator de transcrição responsável pela transdução de sinais específicos do sexo nas células somáticas durante o desenvolvimento gonadal (LIU; BINGHAM; PARKER; YAO, 2009). A deficiência de qualquer dos elementos da via, Wnt4, Rspo1, ou  $\beta$ -catenina, resulta em inversão sexual parcial de ovário para testículo (CHASSOT; RANC; GREGOIRE; ROEPERS-GAJADIEN *et al.*, 2008; LIU; BINGHAM; PARKER; YAO, 2009; TOMIZUKA; HORIKOSHI; KITADA; SUGAWARA *et al.*, 2008; VAINIO; HEIKKILÄ; KISPERT; CHIN *et al.*, 1999).

O *foxl2* juntamente com o receptor de estrógeno ESR1 é importante para manutenção da identidade da gônada feminina, uma vez que a perda da sua função resulta no aumento da expressão do Sox9 e reprogramação das células somáticas femininas em células somáticas masculinas (SINCLAIR; SMITH, 2009; UHLENHAUT; JAKOB; ANLAG; EISENBERGER *et al.*, 2009). Nos teleósteos, o *foxl2* é expresso predominantemente durante o desenvolvimento do ovário de várias espécies incluindo *Oreochromis niloticus*, *Clarias gariepinus*, *Anoplopoma fimbria* (SMITH; GUZMÁN; LUCKENBACH, 2013; SRIDEVI; SENTHILKUMARAN, 2011; WANG; KOBAYASHI; ZHOU; PAUL-PRASANTH *et al.*, 2007). Em zebrafish, são encontradas duas variantes, *fox2la* e *fox2lb*, que em indivíduos mutantes *knockout* para ambas as formas resultaram em inversão do sexo de fêmea para macho (YANG; WANG; LI; ZHOU *et al.*, 2017). Ainda em teleósteos, a via WNT/ $\beta$ -catenina está presente durante o desenvolvimento da gônada feminina de algumas espécies como *Epinephelus coioides* (CHEN; LI; XIAO; ZHANG *et al.*, 2015), *Acanthopagrus schlegeli* (WU; CHANG, 2009). Contudo, o papel e o mecanismo regulador em peixes permanecem bastante obscuros.

## 2. JUSTIFICATIVA

O controle do ciclo reprodutivo em cativeiro é fundamental na sustentabilidade da produção animal. Porém, esse ciclo fica comprometido para algumas espécies de interesse econômico, como por exemplo, o robalo flecha (*Centropomus undecimalis*). Um dos grandes entraves na sua produção consiste na obtenção de fêmeas em cativeiro, por ser uma espécie protândrica, ou seja, atinge a primeira maturação sexual como macho e após determinado período de vida alguns exemplares invertem o sexo (TAYLOR *et al.*, 2000). Desta forma a obtenção dessas fêmeas torna-se dispendiosa devido ao tempo necessário, aproximadamente 3 a 4 anos, para que ocorra a inversão do sexo. Em sistemas de produção essa mudança dificilmente ocorre pelo fato das condições ambientais diferirem do ambiente natural. De acordo com Passini *et al.*, (2019), toda a produção realizada em cativeiro provém de fêmeas selvagens capturadas no ambiente, dificultando uma das etapas da cadeia produtiva, que inclui a domesticação e seleção destes animais. Uma das alternativas para obtenção destas fêmeas em cativeiro consiste na manipulação do sexo gonadal, via esteroides sexuais (CARVALHO *et al.*, 2016). Os esteroides sexuais atuam no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, regulando por exemplo, as kisspeptina, que podem estar envolvidas nos processos de mudança de sexo nos teleósteos (SHI; ZHANG; LI; LIU *et al.*, 2010; TODD; LIU; MUNCASTER; GEMMELL, 2016). Desta forma, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos esteroides 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT) e 17 $\beta$ -Estradiol (E2) durante a diferenciação gonadal de *C. undecimalis*, na expressão do sistema kisspetinas, assim como nos perfis transcriptômicos (RNA-seq) gonadais pós-tratamento.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar a ação dos esteroides sexuais  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT) e  $17\beta$ -Estradiol (E2) no sistema kisspeptinas e na diferenciação gonadal de *C. undecimalis*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Isolar as sequências parciais dos cDNAs do ligante kisspeptina e seus receptores em *C. undecimalis*;
- ✓ Avaliar a ação dos esteroides sexuais (MT, E2) na expressão encefálica de *kiss* e seu receptor durante o desenvolvimento gonadal de *C. undecimalis*;
- ✓ Analisar o efeito do tratamento com MT e E2 nos perfis transcriptômicos das gônadas e identificar os genes diferencialmente expressos (GDEs) entre os tratamentos;
- ✓ Fazer análises de enriquecimento dos GDEs com a finalidade de obter vias e processos biológicos que estejam alterados.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Animais

Para este trabalho, foram utilizados 450 juvenis de robalo-flecha provenientes do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Universidade de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis. O peso médio dos juvenis antes do início experimental era de 9,55 gramas, com média de comprimento total de 10,73 cm e média do comprimento padrão de 8,69 cm. Todos os peixes foram mantidos sob condições de temperatura natural e fotoperíodo controlado de 10 horas de luz. O experimento foi desenvolvido no Laboratório Nacional de Aquicultura Marinha (LANAM), situado no município de Ilha

Comprida, na Mesorregião do litoral sul paulista e microrregião de Registro no Vale do Ribeira.

#### 4.2. Desenho dos primers e caracterização parciais dos cDNAs das kisspeptinas e seus receptores em *C. undecimalis*

Os primers para reação da RT-PCR para os transcritos de *kiss1*, *kissr2* e *kissr3* de *C. undecimalis* foram desenhados utilizando como referência sequências de *kiss1* de *Seriola lalandi* (HQ449729.1), *kissr2* de *Solea senegalensis* (EU136710.1) e *kissr3* de *Morone saxatilis* (KJ725183.1) (Tabela 1). Todas essas sequências estão depositadas no banco de dados público internacional National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os produtos amplificados com os primers foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e as bandas com o peso molecular esperado foram extraídas do gel. Os produtos foram purificados por QUIAEX II Agarose Gel Extraction Handbook (QUIAGEN), tratados com ExoSAP-IT, e submetidos a uma reação de sequenciamento utilizando *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer de acordo com as recomendações do fabricante. A obtenção do cDNA parcial para os genes foi confirmada por alinhamento com outras sequências já depositadas no GenBank usando interface de BLASTN. Após sua confirmação, primers específicos (Tabela 1) foram desenhados para as reações de qRT-PCR.

Além disso, as sequências obtidas foram codificadas em proteínas e posteriormente comparadas com outras sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados do servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Material suplementar, Figura 1, Figura 2 e Figura 4), nas quais foram realizados alinhamentos múltiplos com o ClustalX alignment software, que faz parte do pacote MEGA v.6.06 (versionLabel) e,

adicionalmente, alinhamentos com a ferramenta Clustalw3 disponível no servidor do The European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw3/>), afim de se localizar os sítios conservados das sequências de aminoácidos (Material suplementar, Figura 3 e Figura 5). Para determinar os possíveis domínios da proteína, utilizou-se o pacote de ferramentas disponíveis no servidor Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)

**Tabela 1.** Lista de primers utilizados para RT-PCR e qRT-PCR

| Target        | Sequence (5'-3')                                           | Type    |
|---------------|------------------------------------------------------------|---------|
| <i>kiss1</i>  | CGACTCATTGTCGCTCTGATG (Fw)<br>GTCTACGTTACGGAAAGTGACAC (Rv) | RT-PCR  |
| <i>kissr2</i> | GTGGCTCTGGTCGTGGTGTG (Fw)<br>CTCACGAGAACTGGAGGTGCC (Rv)    | RT-PCR  |
| <i>kissr3</i> | CTCTGCGACACCGAACCCC (Fw)<br>CCTTCAAGCACGCCTTCCCTG (Rv)     | RT-PCR  |
| <i>kiss1</i>  | AGCCCTGGGAGTTTTAAGCC (Fw)<br>GGGAGACTGTCCATCAGTTGAA (Rv)   | qRT-PCR |
| <i>kissr2</i> | GGACCCATCCAGATCTTCGTC (Fw)<br>GTTGGCCCCACGTCTTGATCT (Rv)   | qRT-PCR |
| <i>kissr3</i> | CTCACCATCACCGCCTGTTA (Fw)<br>CGGCCTGAACCTGAAATTGG (Rv)     | qRT-PCR |
| Bactin        | GCTGTCCCTGTATGCCTCTG (Fw)<br>ACTGTGTGGGTCACACCATC (Rv)     | qRT-PCR |

Fw, forward; Rv, reverse.

#### 4.3. Delineamento experimental

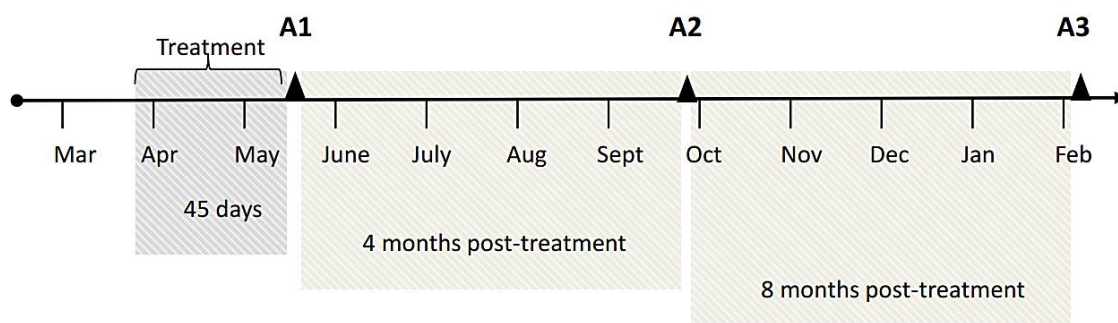
Cada tratamento (controle, MT, E2) foi feito em três réplicas, compostas por 50 juvenis em cada réplica, totalizando 450 juvenis, distribuídos aleatoriamente em nove tanques retangulares com 12m<sup>3</sup>, com renovação de água marinha semanal.

O tratamento com E2 foi realizado de acordo com Carvalho *et al.*, (2014), que obtiveram uma taxa de feminização de 90% de *C. undecimalis* utilizando rações com 100mg E<sub>2</sub> KG<sup>-1</sup> durante 45 dias. Desta forma, foi realizado o mesmo protocolo, utilizando

uma ração comercial 45 % de proteína bruta (PB) a qual foi adicionado 100 mg de E2 (Sigma). Já para o tratamento com MT, a dosagem utilizada foi de 60mg MT KG<sup>-1</sup>, dose que induziu maior taxa de masculinização em *Oreochromis niloticus* (EL-GREISY; EL-GAMAL, 2012).

As rações contendo diferentes hormônios foram preparadas uma semana antes do início do experimento. O hormônio foi diluído em álcool absoluto em uma solução estoque. Em seguida, uma alíquota da solução estoque foi diluída em 250 ml de álcool etílico P.A. e pulverizado homogeneamente em um quilograma 1 kg de ração que seguiu para o processo de secagem em ambiente protegido da luz por 48 horas. Após a completa evaporação do álcool, a ração foi armazenada em geladeira. A ração do tratamento controle recebeu apenas o veículo (álcool etílico P.A.). Os juvenis foram alimentados diariamente, quatro vezes ao dia até a saciedade aparente, utilizando ração comercial com adição do hormônio durante 45 dias.

As coletas foram realizadas em três períodos A1, A2 e A3. O período A1 foi logo após o termino do tratamento; a coleta A2 ocorreu quatro meses pós-tratamento e a A3, com oito meses após o tratamento (Figura 5). Os tecidos coletados (n=5 por réplica) foram submetidos às análises histológicas (gônadas), expressão gênica (encéfalo e gônada) e RNA-seq (gônadas).



**Figura 5.** Esquema do delineamento experimental das coletas. A1, A2 e A3 representam as coletas realizadas.

#### 4.4. Análise filogenética

As análises filogenéticas foram conduzidas com as sequências parciais amplificadas e sequenciadas do *cDNA* para o ligante e para o receptor da kisspeptina, comparando-as com outras sequências depositadas no banco de dados do servidor NCBI. As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE com parâmetros padrão e em seguida foram editadas utilizando programa GENEIOUS. As análises evolutivas foram conduzidas pelo método de máxima verossimilhança (ML) com RAxML (STAMATAKIS, 2014), utilizando a plataforma CIPRES Science Gateway ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)), empregando o modelo de evolução GTR (general time reversible) + G (gama) e o teste de bootstrap com 1000 réplicas.

#### 4.5. Análises de expressão gênica: qRT-PCR

Para expressão gênica, foram coletados encéfalos (n = 3 por réplica) dos *C. undecimalis*, os quais foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80 °C até o momento da extração de RNA. O RNA total foi extraído usando o protocolo de extração pelo método TRIzol (Invitrogen, CA, USA) de acordo com o fabricante. A concentração do RNA total (ng/ul) foi mensurada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop One (*ThermoFisher*). Posteriormente, para eliminar contaminação por DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase I Amplification Grade, seguindo as instruções do fabricante. A ausência de DNA genômico e a qualidade dos RNAs extraídos foram verificadas por eletroforese em gel de agarose. A reação da síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada usando 1 µg de RNA total, utilizando random hexamers e Superscript II Reverse Transcriptase Kit (*ThermoFisher*) de acordo com as

recomendações do fornecedor. As reações de PCR e qRT-PCR foram realizadas com *primers* específicos (Tabela 1) na concentração de 9nM para cada *primer* (*forward* and *reverse*) em reações de 10 µl, utilizando SYBR Green (*Applied Biosystem*) como master mix. As reações foram submetidas a 40 ciclos (5 min. a 95°C, 40 ciclos de desnaturação à 95°C, 30 s. a 60°C e 30s a 72°C) utilizando o termociclador StepOne Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*).

A expressão relativa dos genes estudados, *kiss1* e *kissr2*, foi determinada pelo método ddCT. Para normalização dos níveis de expressão foram testados dois genes endógenos,  $\beta$ -actina e o fator de alongação 1- $\alpha$ , dos quais a  $\beta$ -actina apresentou maior estabilidade. Assim, os níveis de expressão dos genes (Cts) foram normalizados utilizando como controle a  $\beta$ -actina (dCTs) e posteriormente calibrados com base nos valores de expressão do grupo controle de cada tratamento.

#### 4.6. Análises histológicas

As gônadas dos animais (n= 5 por réplica) foram fixadas em Karnovsky - solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. Após fixação, o material foi desidratado em uma série crescente de álcool (70% por 4 horas; 95% por 4 horas), infiltrado e incluído em historesina Leica (metacrilato glicol). Cortes histológicos seriados longitudinais das gônadas de juvenis, com 3 µm de espessura, foram obtidos em micrótomo equipado com navalhas de vidro e foram corados com PAS (Ácido Periódico em Reativo de Schiff) + Hematoxilina Férrica + Amarelo Metanil. Para análise e documentação histológica foi utilizado o microscópio invertido Leica DMI4000B equipado de câmera digital de alta definição (Leica ICCD50 HD). Os registros fotográficos foram feitos por meio do software LAS EZ Leica que

acompanha o microscópio utilizado, pertencente ao Laboratório de Biologia Molecular e Reprodutiva, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

#### 4.7. Análise Estatística

Diferenças significativas foram identificadas utilizando o teste de Student (não pareado) e ANOVA ( $p < 0,05$ ). GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

#### *Transcriptoma (RNA-seq) gonadal dos diferentes grupos experimentais*

Para avaliar os efeitos das diferentes dietas (controle, MT, E2) na diferenciação gonadal de *C. undecimalis*, as gônadas dos indivíduos de 4 meses pós-tratamento (A2) foram submetidas às análises de transcriptoma (RNA-seq). O critério para seleção dos indivíduos da coleta A2 foi baseado nas diferenças morfológicas das gônadas que apresentavam sinais de diferenciação gonadal em testículos ou ovários.

Foram sequenciadas 3 amostras por tratamento, (MT=3, E2=3 e controle=3) totalizando 9 amostras. Cada amostra biológica foi constituída de um “pool” de três gônadas. O RNA total de cada gônada foi extraído utilizando o kit de extração *Ambion RNeasy-Micro* (Thermo Fisher Scientific, AM1931), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, a quantidade e a integridade do RNA foram avaliadas utilizando-se o equipamento Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer Instrument G2939A (Agilent Technologies, Böblingen, Alemanha). Somente as amostras que apresentaram o valor de RIN (*RNA Integrity Number*) acima de 8 foram enviadas para o sequenciamento. O sequenciamento foi conduzido pela Beijing Genomics Institute (BGI) (Hong Kong,

China) utilizando a plataforma Illumina – Hiseq 2000, seguindo protocolo padrão de preparação de bibliotecas de mRNA. O sequenciamento foi realizado a partir de ambas as extremidades dos fragmentos (*paired-end*), *depth sequencing*, e as leituras (*reads*) geradas continham 150 pares de base.

#### 4.8. Montagem ‘de novo’ e anotação funcional do transcriptoma

As análises de bioinformática foram conduzidas sob a supervisão do Prof. Dr. Manfred Schartl na Universidade de Würzburg, Alemanha, em parceria com bioinformata Profa. Dra. Susanne Kneitz, durante o estágio BEPE-FAPESP, Processo:19/19874-7.

A montagem do transcriptoma *de novo* foi feita para uma amostra de cada tratamento utilizando o Trinity (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq>). Em seguida, com base no banco de dados do Evidentialgene, foram removidas todas as sequências biológicas não válidas e mantidas todas as sequências biológicas válidas (<https://sourceforge.net/projects/evidentialgene>). Subsequentemente, os três cDNA fastas filtrados foram combinados e utilizados como uma nova entrada para o Trinity e posteriormente para o Evigene. Com a montagem dessas sequências combinadas, o restante das amostras foi mapeado utilizando alinhador *RNA-Seq* STAR. Por fim, uma avaliação quantitativa da integridade da montagem do transcriptoma foi realizada utilizando a ferramenta BUSCO (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs* v3.02) (SIMÃO; WATERHOUSE; IOANNIDIS; KRIVENTSEVA *et al.*, 2015). Para esta avaliação, o conjunto de transcritos montados do *C. undecimalis* foi comparado a um conjunto de 4584 genes de cópia única que estão presentes em pelo menos 90% das espécies de Actinopterygi.

A anotação funcional do transcriptoma foi conduzida de acordo com pipeline Trinotate (*Transcriptome Functional Annotation and Analysis* (<https://trinotate.github.io>))

e com BUSCO. Os *contigs* foram traduzidos em sequências de proteínas putativas utilizando TransDecoder e anotados com base na comparação entre as sequências do banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot utilizando Blastx e Blastp.

#### 4.9. Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos (GDEs)

A detecção dos genes diferencialmente expressos (GDEs) foi realizada no ambiente R/Bioconductor utilizando o método DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Nesta análise foram comparadas as amostras do grupo E2 em relação ao controle (E2/CTRL), o grupo MT foi comparado ao controle (MT/CTRL) e por fim fizemos uma comparação entre os grupos tratados, ou seja, o grupo MT em relação ao E2 (MT/E2). Em seguida, estabelecemos os seguintes padrões: genes com um  $\log_2$  Fold Change  $>1$  ou  $\log_2$ FoldChange $<-1$  e p-valor ajustado  $<0,05$  foram considerados como diferencialmente expressos. Uma vez determinado os GDEs, os genes foram analisados do ponto de vista funcional através da análise de enriquecimento dos termos de ontologia gênica (*Gene Ontology*-GO) e das vias metabólicas disponibilizadas pelo KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Para ambas análises de enriquecimento utilizamos os genes ortólogos de humanos e foram conduzidas na plataforma DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) (HUANG; SHERMAN; TAN; COLLINS *et al.*, 2007).

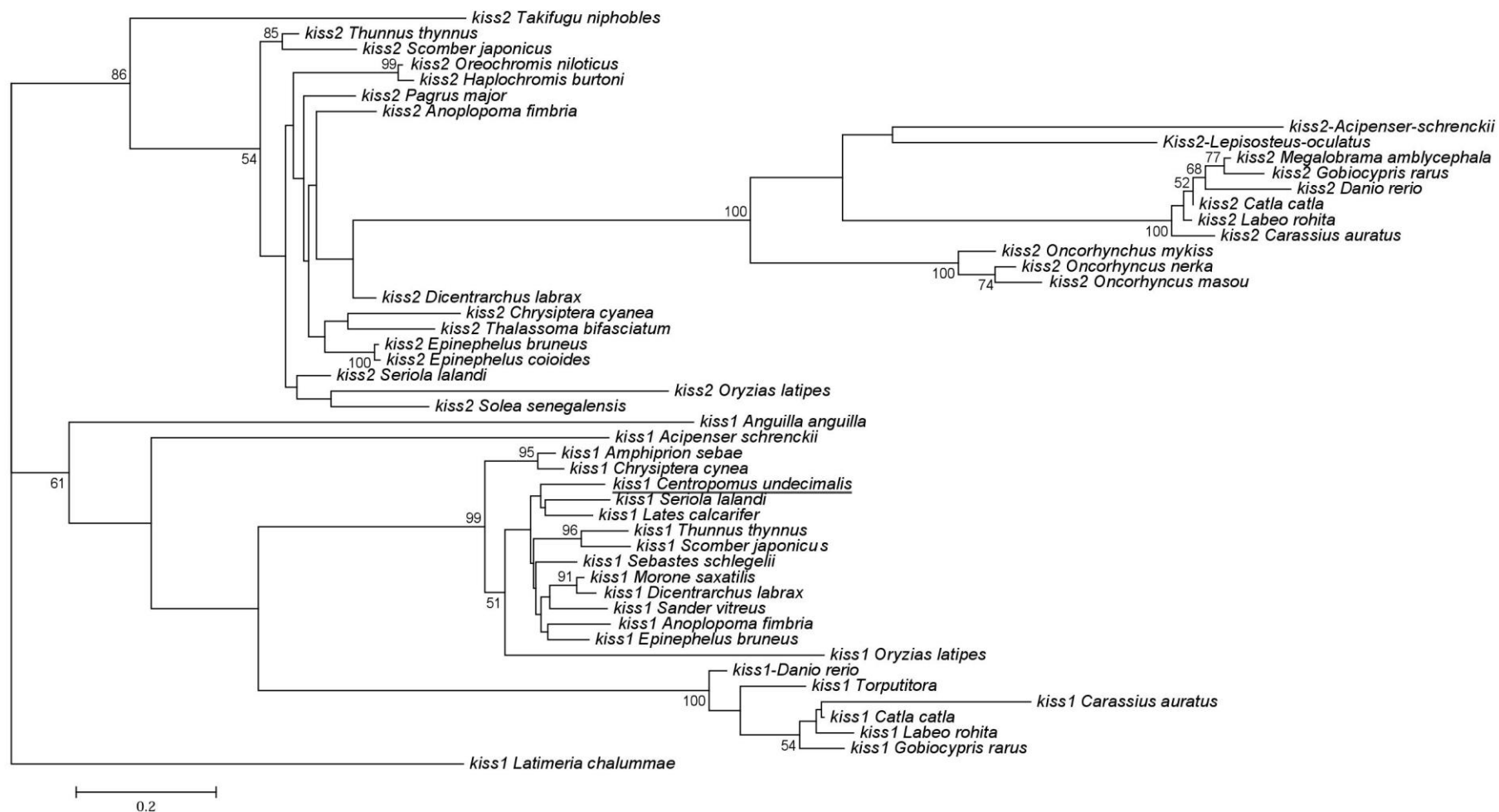
Para visualizar de uma forma global as similaridades e as diferenças dos perfis transcriptômicos entre os tratamentos foram realizadas abordagens exploratórias de análises de dados como Análise Correspondente (CA), *cluster heat map* ou clustergrama. Estas análises foram geradas utilizando pacote R/Bioconductor.

## 5. RESULTADOS

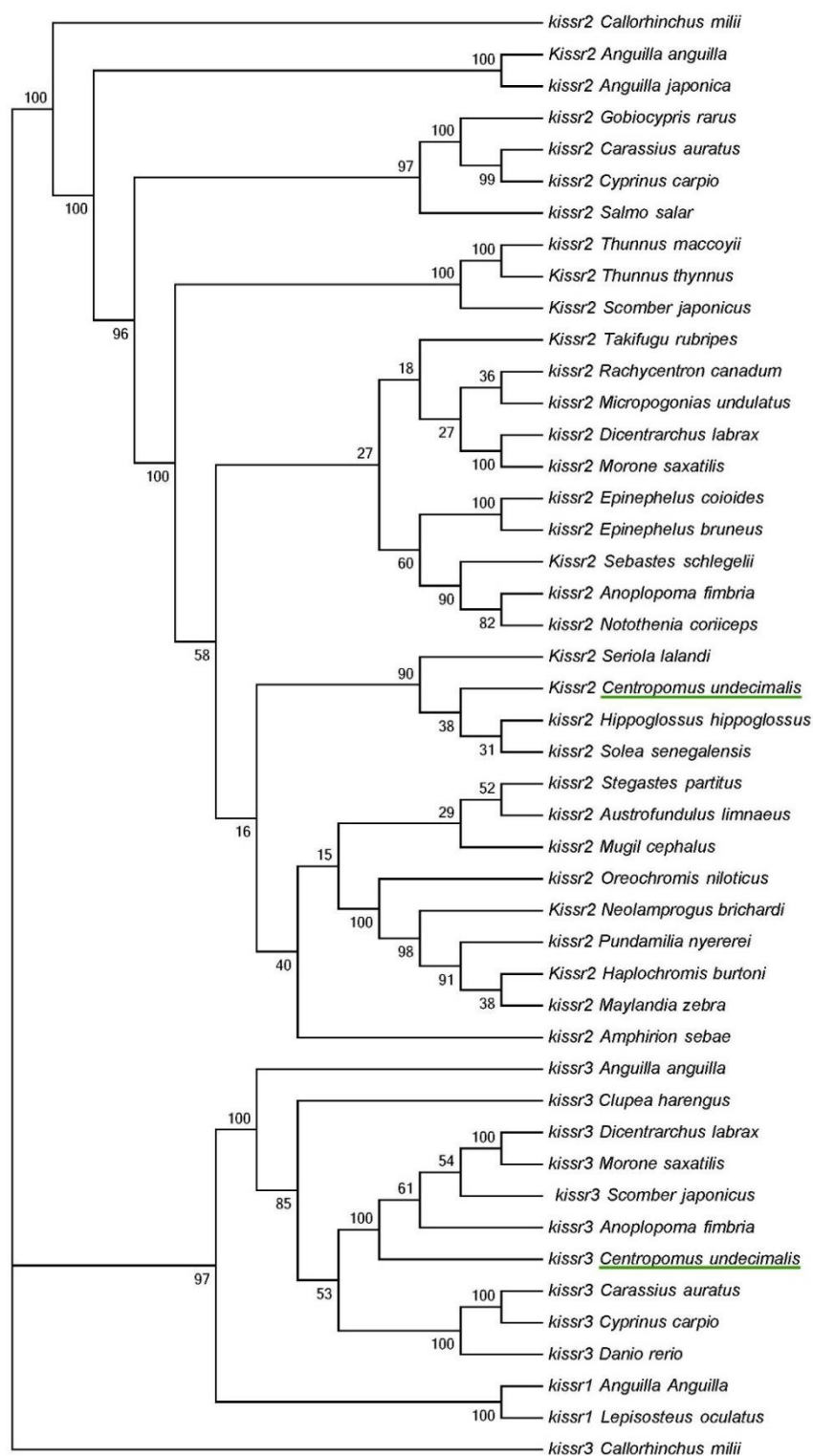
### 5.1. Análises filogenéticas das sequências parciais do cDNA da *kiss1*, *kissr2* e *kissr3* de *Centropomus undecimalis*.

As árvores filogenéticas obtidas utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança através do RaxML para *kiss* e *kissr* de *C. undecimalis* estão demonstradas nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Na árvore do ligante da kisspeptina foi possível observar uma topologia consistente formando dois clados distintos, para *kiss2* e *kiss1* (Figura 6), porém com valores de bootstrap menores, o grupo externo utilizado para enraizar foi *kiss1 Latimeria chalumnae*. Para o receptor da kisspeptina foi possível observar uma topologia bem consistente formada por dois clados com alto suporte, enraizados no grupo externo *kissr3 Callorhincus milli*. Ademais, ainda é possível observar um clado formado por *kissr2*, e outro agrupando *kissr3* e *kissr1* (Figura 7).

A sequência parcial do *kiss1* de *C. undecimalis* formou um grupo irmão com *Seriola lalandi* e *Lates calcarifer*, que por sua vez formou um grupo com mais representantes dos Perciformes (*Epinephelus bruneus*, *Sander-vitreus*, *Dicentrarchus-labrax*, *Morone. saxatilis*, *Scomber japonicus* e *Thunnus Thynnus*) e alguns Scorpaeniformes (*Anoplopoma fimbria* e *Sebastes-schlegelii*) (Figura 6). A sequência parcial de *kissr2* de *C. undecimalis* demonstrou proximidade com as sequências de *kissr2* das espécies da ordem Pleuronectiformes (*Hippoglossus hippoglossus* e *Solea senegalensis*) e Perciformes (*Seriola lalandi*) (Figura 7). Já o *kissr3* de *C. undecimalis*, formou um grupamento irmão com os Perciformes (*D. labrax*, *M. saxatilis* e *Scomber japonicus*) e com Scorpaeniformes (*A. fimbria*) (Figura 7).



**Figura 6.** Árvore filogenética construída baseada nas regiões codificantes do DNA para o gene ligante da kisspetina. O método utilizado foi de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de bootstrap. O número mostrado em cada nó indica o valor de bootstrap (%), somente valores acima de 50 estão presentes. A árvore foi enraizada na sequência do *kiss1 Latimeria chalumnae*.

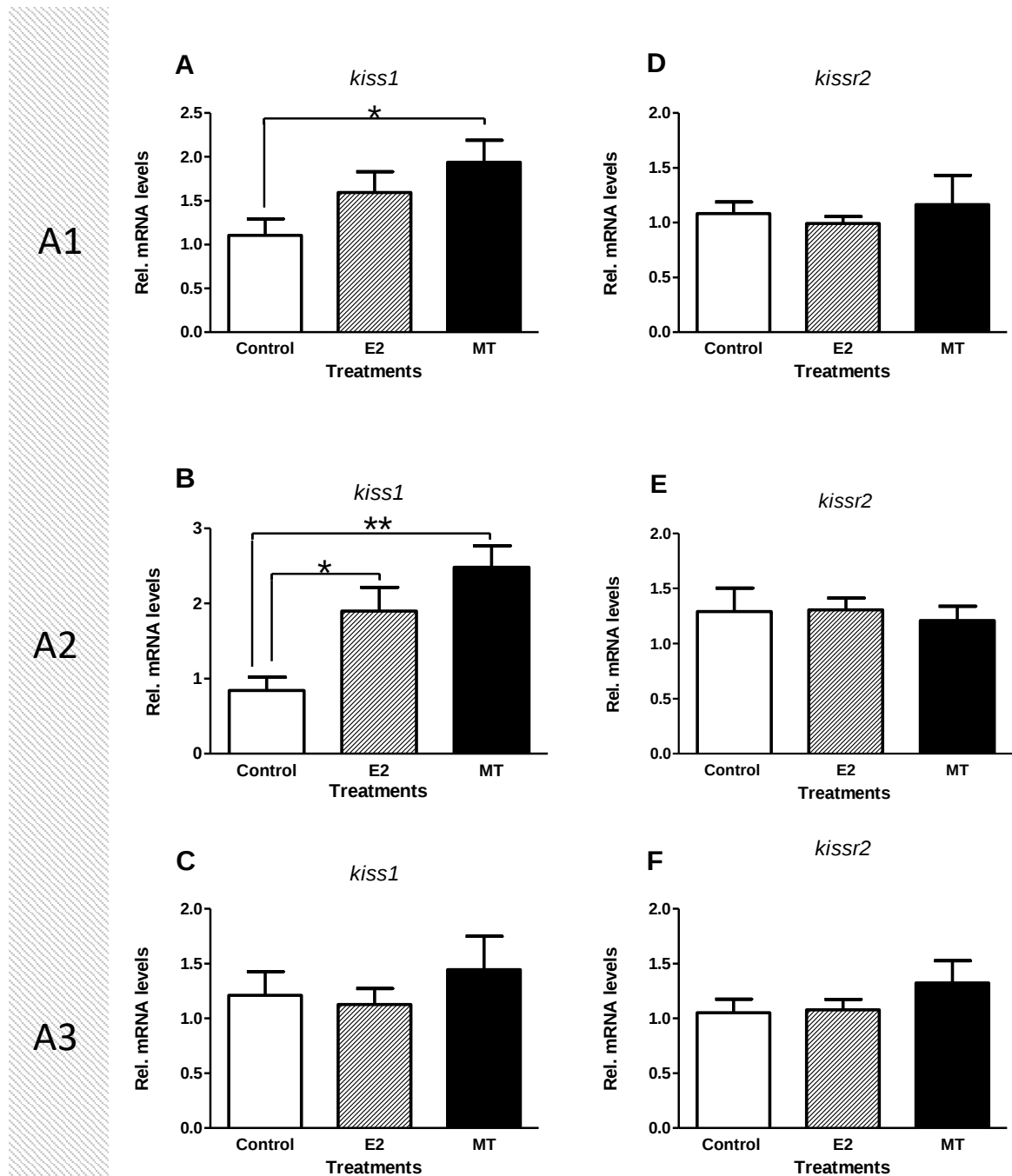


**Figura 7.** Árvore filogenética construída baseada nas regiões codificantes do DNA para o gene receptor da kisspetina. O método utilizado foi de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de bootstrap. O número mostrado em cada nó indica o valor de bootstrap (%). A árvore foi enraizada na sequência do *kissr3* de *Callorhynchus milii*.

## 5.2. Expressão gênica (qRT-PCR)

Para avaliar o efeito dos tratamentos hormonais no sistema kisspeptina, os níveis de expressão de *kiss1* e *kissr2* foram avaliados por qRT-PCR nos diferentes períodos amostrados (A1, A2 e A3) (Figura 8).

Os animais que receberam dieta com MT apresentaram maior expressão de *kiss1* no período A1 quando comparados com o grupo controle (Figura 8A). Já no período A2, os grupos tratados tanto com MT ou E2 tiveram um aumento nos níveis de expressão de *kiss1* em relação ao controle, no entanto, não houve diferença de expressão de *kiss1* entre os grupos MT e E2 (Figura 8B). No terceiro período de coleta avaliado (A3), os níveis relativos de *kiss1* não diferiram estaticamente entre os grupos experimentais (Figura 8C). Em relação à *kissr2*, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos para os períodos analisados (Figura 8D, 8E e 8F).



**Figura 8.** Efeito dos hormônios (E2) e (MT) nos níveis de RNAm dos genes *kiss1* e *kissr2* em encéfalos de *C. undecimalis*, avaliados por qRT-PCR. (A, D) Legenda: Tempo pós-tratamento hormonal: A1= 45 dias, A2= 4 meses, A3= 8 meses. A expressão foi normalizada pelo gene de referência  $\beta$ -actina e os valores expressos em relação à média do controle de cada grupo (0,01)\*, (0,001) \*\* asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

### 5.3. Análises morfológicas

Em todos os tratamentos e períodos avaliados, os animais apresentaram gônadas pares, localizadas ventro-lateralmente a bexiga natatória, e estendendo-se por toda

cavidade celomática até a papila-urogenital, com estrutura filiforme e coloração transparente (Figura 9).



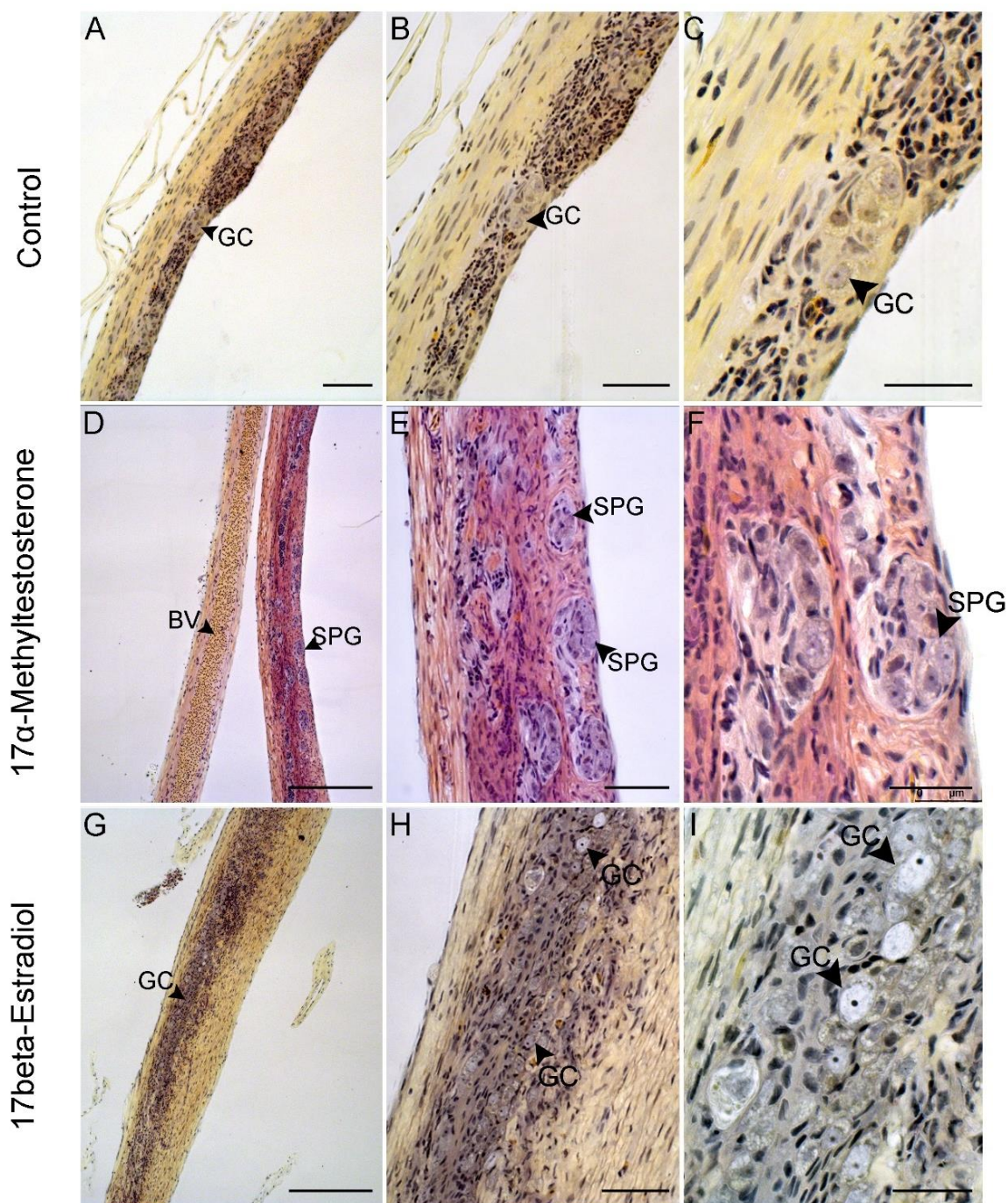
**Figura 9.** Morfologia externa da gônada de *Centropomus undecimalis*, mostrando gônada posicionada ventro-lateralmente a bexiga natatória e estendendo-se por toda cavidade celomática. Notar o tamanho e espessura reduzida do órgão, com aparência translúcida.

#### 5.3.1. Grupo A1

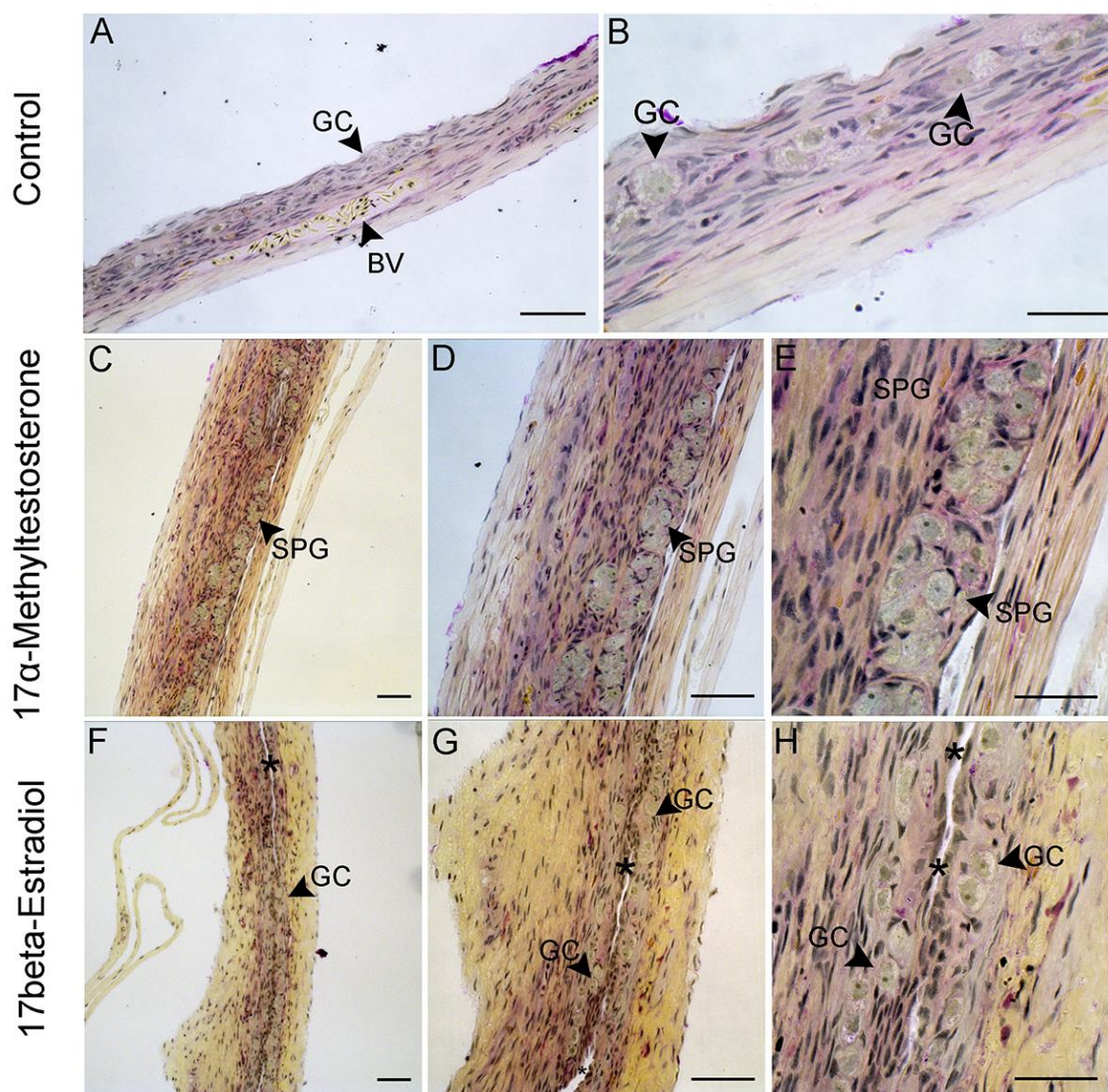
No grupo controle, a gônada é composta por um tecido conjuntivo abundante, muitas células somáticas e algumas células germinativas isoladas ou em cistos (Figura 10A, 10B, 10C). Já nos animais que receberam dieta contendo MT, o desenvolvimento gonadal apresentou-se mais avançado quando comparado ao controle (Figura 10D, 10E, 10F). O tecido gonadal destes animais é formado por várias camadas de células somáticas, e as células germinativas, em maior quantidade, estão organizadas em grupos majoritariamente localizados na periferia do tecido (Figura 10D, 10E, 10F). No grupo que recebeu E2, o tecido gonadal é mais espesso, sendo constituído em sua maior parte por tecido conjuntivo, células germinativas e somáticas que estão localizadas na região central do tecido (Figura 10G, 10H, 10I).

### 5.3.2. Grupo A2

Neste período de coleta A2, a gônada do grupo controle permaneceu pouco desenvolvida em relação aos demais grupos experimentais. O tecido é composto de poucas camadas de células somáticas e algumas células germinativas isoladas ou em cistos (Figura 11A, 11B). No grupo tratado com MT, o tecido gonadal apresenta células germinativas em cistos formando um cordão periférico circundando por tecido conjuntivo (Figura 11C). No grupo tratado com E2, as células somáticas delaminam-se e formam um lúmen, o qual é margeado por células germinativas e células somáticas, além de uma espessa camada de tecido conjuntivo externo (Fig. 11F, 11G, 11H).



**Figura 10.** Corte histológico longitudinal das gônadas de *Centropomus undecimalis* no período de coleta A1. Comparação entre os grupos controle (A, B, C), grupo tratado com MT (D, E F) e tratado com E2 (G, H, I). (A, B, C) No grupo controle o desenvolvimento da gônada encontra-se no estágio inicial com poucas células germinativas individualizadas ou em cistos. (D, E, F) Tecido gonadal em desenvolvimento com células germinativas formando cordões periféricos com reestruturação das células somáticas para formação do ducto. (G, H, I) Gônada com células germinativas na região medial do tecido delimitada por espessa camada de tecido conjuntivo. Legendas: (GC) célula germinativa, (SPG) espermatogônia. Coloração: PAS + hematoxilina férrica + amarelo metanil . Barras: A=75µm. D, G= 250 µm. B, E, H = 50µm. C, F, I= 25 µm.

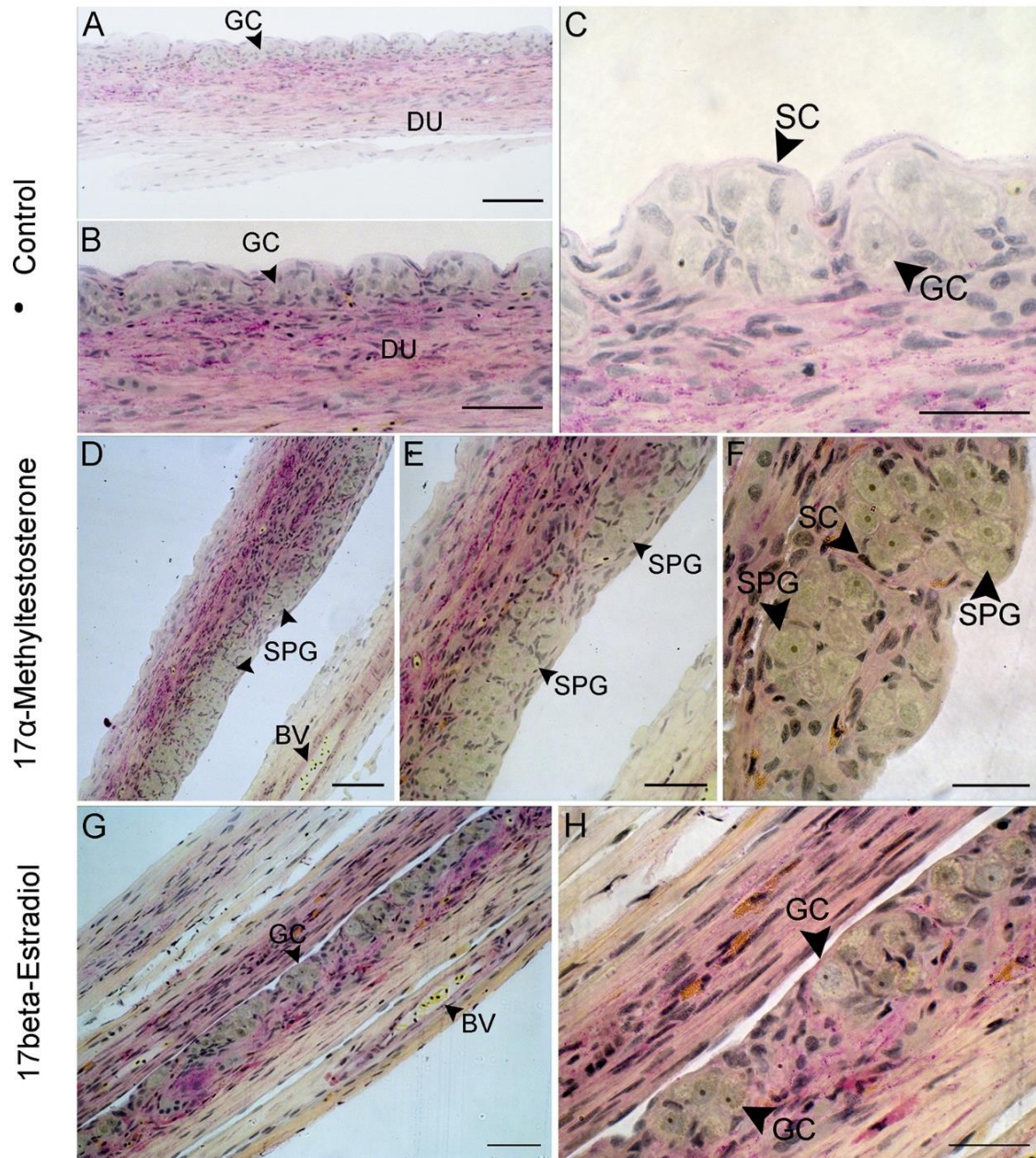


**Figura 11** - Corte histológico longitudinal das gônadas de *Centropomus undecimalis* no período de coleta A2. (A, B) Gônada do grupo controle em desenvolvimento inicial com células germinativas individualizadas ou em cistos circundadas por tecido conjuntivo. (C, D, E) Grupo tratado com metiltestosterona apresenta gônada em estágio de desenvolvimento avançado comparado ao controle. As células germinativas estão organizadas em cordões periféricos. (F, G, H) Gônada dos animais tratados com E2, as células germinativas estão distribuídas bilateralmente e voltadas para uma cavidade central. Legendas: (GC) célula germinativa, (SPG) espermatogônia. (\*) lúmen. Coloração: PAS + hematoxilina férrica + metanil yellow. Barras: A= 50  $\mu$ m. C, F= 75  $\mu$ m. D, G= 50  $\mu$ m. E, H= 25  $\mu$ m.

### 5.3.3. Grupo A3

As gônadas do grupo controle têm um avanço em seu desenvolvimento e possui estrutura similar à gônada do grupo tratado com MT, onde é possível notar a presença de grupos de células germinativas formando *clusters* localizados em uma das margens do tecido (Figura 12A, 12B, 12C). No grupo tratado com MT, a gônada continua com o mesmo padrão da coleta anterior, porém o cordão de células germinativas periféricas

apresenta maior quantidade de células (Figura 12D, 12E, 12F). Os animais que receberam E2 apresentam tecido gonadal com lúmen e a quantidade dos grupos de células germinativas é maior quando comparada aos estágios anteriores (Figura 12G, 12H).



**Figura 12.** Corte histológico longitudinal das gônadas de *Centropomus undecimalis* no período de coleta A3. (A, B, C) Gônada do grupo controle mostrando a formação de cordões de células germinativas localizadas em uma única extremidade do tecido, característico do desenvolvimento de gônada masculina. (D, E, F) Gônada do grupo MT apresentando um aumento do número de espermatogônias, envoltas por células de Sertoli. (G, H) Gônada dos animais tratado com E2 apresentando as células germinativas posicionadas na região medial voltadas para cavidade que originará a cavidade ovariana. Legendas: (GC) célula germinativa, (SPG) espermatogônia, (SC) células de Sertoli, (BV) vaso sanguíneo. Coloração: PAS + hematoxilina férrica + metanil yellow. Barras: A, D = 75  $\mu$ m; B, E, G = 50  $\mu$ m; C, F, H = 25  $\mu$ m

#### 5.4. Transcriptoma e montagem de novo

O resultado do sequenciamento gerou um total de 548,910,191 *clean reads* obtidos das três réplicas de cada grupo Controle, E2 e MT (**Tabela 2**). A montagem do transcriptoma feita através do programa Trinity resultou no total de 45519 transcritos com tamanho médio de 277 pbs e máximo de 5549pbs.

**Tabela 2.** Dados do RNA-seq das gônadas.

| Sample    | Treatment | Clean Reads | Clean bases    | Read length (bp) | Q20(%) | GC(%)  |
|-----------|-----------|-------------|----------------|------------------|--------|--------|
| Control 1 | Control   | 103,295,542 | 15,494,331,300 | 150              | 95,77% | 47,10% |
| Control 2 |           | 67,935,230  | 10,190,284,500 | 150              | 96,17% | 47,11% |
| Control 3 |           | 67,520,966  | 10,128,144,900 | 150              | 96,33% | 47,50% |
| E2 4      | E2        | 68,585,378  | 10,287,806,700 | 150              | 96,19% | 47,91% |
| E2 5      |           | 66,835,988  | 10,025,398,200 | 150              | 96,29% | 47,31% |
| E2 6      |           | 104,551,485 | 15,625,398,200 | 150              | 95,15% | 47,35% |
| MT 7      | MT        | 68,855,381  | 10,007,546,700 | 150              | 96,18% | 47,19% |
| MT 8      |           | 67,170,323  | 10,188,130,500 | 150              | 96,17% | 47,25% |
| MT 9      |           | 105,881,706 | 15,882,255,900 | 150              | 95,26% | 47,69% |

A avaliação da montagem dos transcritos utilizando o *software* BUSCO resultou no total de 3926 (85,6%) BUSCOS completos, dos quais 3489 (76,1%) foram ortólogos completos de cópia simples, 437 (9,5%) ortólogos completos de cópia duplicada, 231 (5%) BUSCOs fragmentados e 427 (9,4%) BUSCOs ausentes (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análise da integridade do genoma usando BUSCO.

|                                        |      |       |
|----------------------------------------|------|-------|
| Complete orthologs                     | 3926 | 85,6% |
| Complete and single-copy orthologs (S) | 3489 | 76,1% |
| Complete and duplicated orthologs (D)  | 437  | 9,1 % |
| Fragmented orthologs (F)               | 427  | 5%    |
| Missing orthologs                      | 427  | 9,4%  |
| Total ortholog groups searched         | 4584 | -     |

#### 5.4 Análise exploratória

A análise de correspondência (CA) obtida dos GDEs mostrou a formação de três grupos separados no gráfico Figura 13A). Cada grupo estava composto somente por suas réplicas biológicas. Esse resultado demonstra que as réplicas biológicas de cada grupo apresentaram baixa variabilidade. É possível notar também que os grupos mostraram perfis transcriptômicos diferentes (Figura 13A).

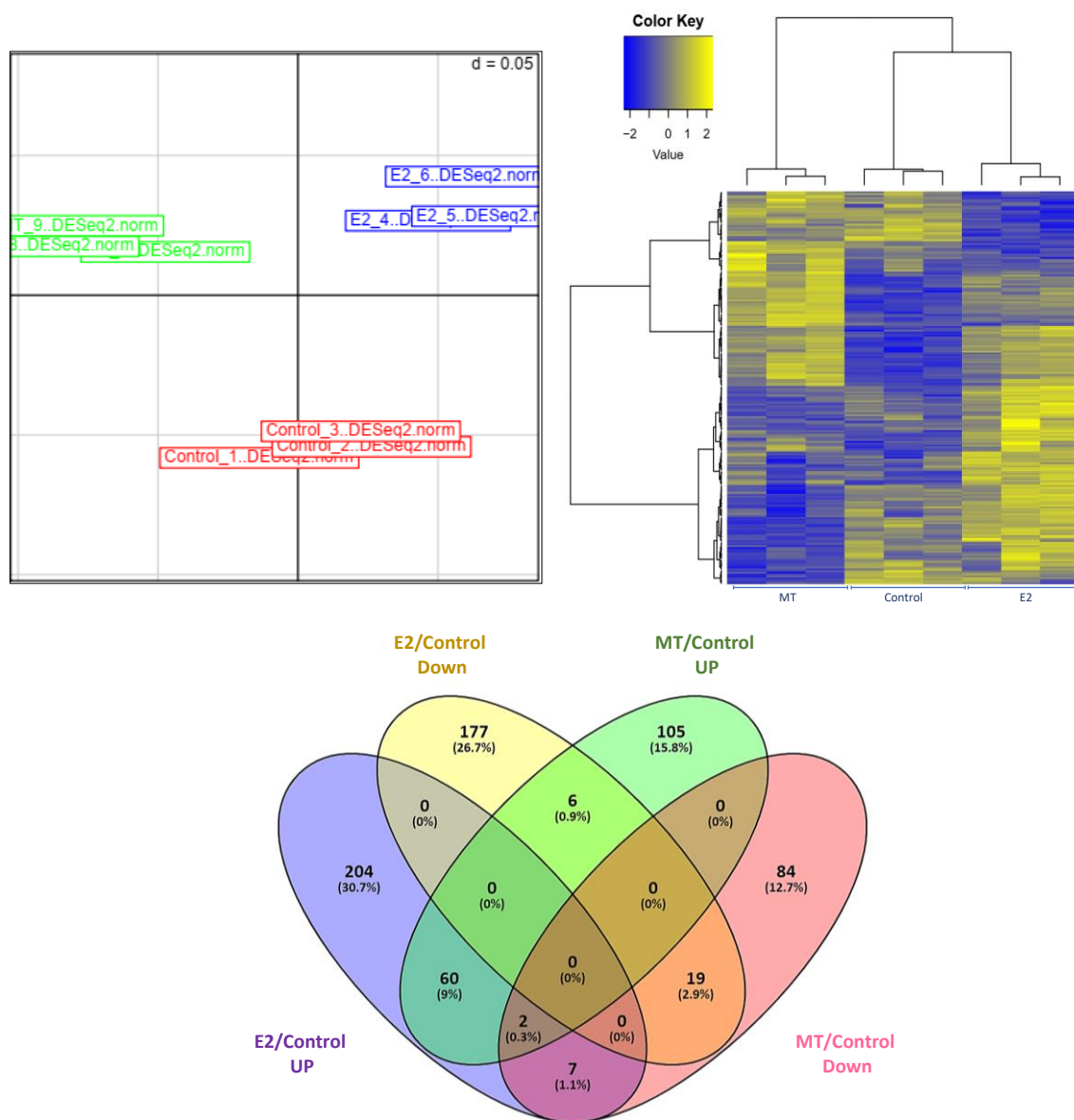
O cluster hierárquico e *heatmap* permitiram visualizar os perfis transcriptômicos entre os grupos MT, Controle e E2 (Figura 13B). No *heatmap* cada coluna representa uma réplica biológica e cada célula um transcrito. Desta forma, nota-se que as réplicas biológicas apresentaram baixa variabilidade e que os grupos têm padrões de expressão gênica distintos (Figura 13B).

#### 5.5. Análise dos GDEs e de enriquecimento funcional

Na análise dos GDEs entre os grupos tratados com E2 vs. Controle foram encontrados 475 transcritos, sendo 273 regulados positivamente e 202 negativamente (Figura 13C). Já a comparação entre os grupos tratados com MT vs. Controle resultou em número menor de GDEs, no total foram encontrados 285 transcritos dos quais 173 sofreram regulação positiva e 112 e negativa (Figura 13C).

A construção do diagrama de Venn contendo os GDEs possibilitou identificar os genes que tiveram regulação específica, comum e antagônica em resposta aos esteroides. Em relação aos genes que responderam de forma específica, 204 e 105 foram regulados positivamente nas comparações entre os grupos E2 vs. Controle, e entre os grupos MT vs. Controle, respectivamente (Figura 13C). Por outro lado, o número genes regulados negativamente de forma específica foram 177 na comparação entre E2 vs. Controle e 84

quando comparados os grupos MT vs. Controle (Figura 13C). Em ambos os tratamentos (MT e E2), 60 genes foram regulados positivamente e 19 genes foram regulados negativamente. Um total de 13 GDEs apresentam regulação antagônica, dentre eles 7 genes (*nogg3*, *tc1a*, *smoc1*, *pkhn1*, *pnph*, *glt18* e *cp4v2*) tiveram uma regulação positiva em resposta ao E2 e negativa ao MT (Figura 13C). Assim como, 6 genes (*cad26*, *ntcp2*, *wnt2b*, *dab2*, *cxar* e *home1*) tiveram um aumento na expressão em resposta ao MT e uma diminuição em relação ao E2 (Figura 13C).



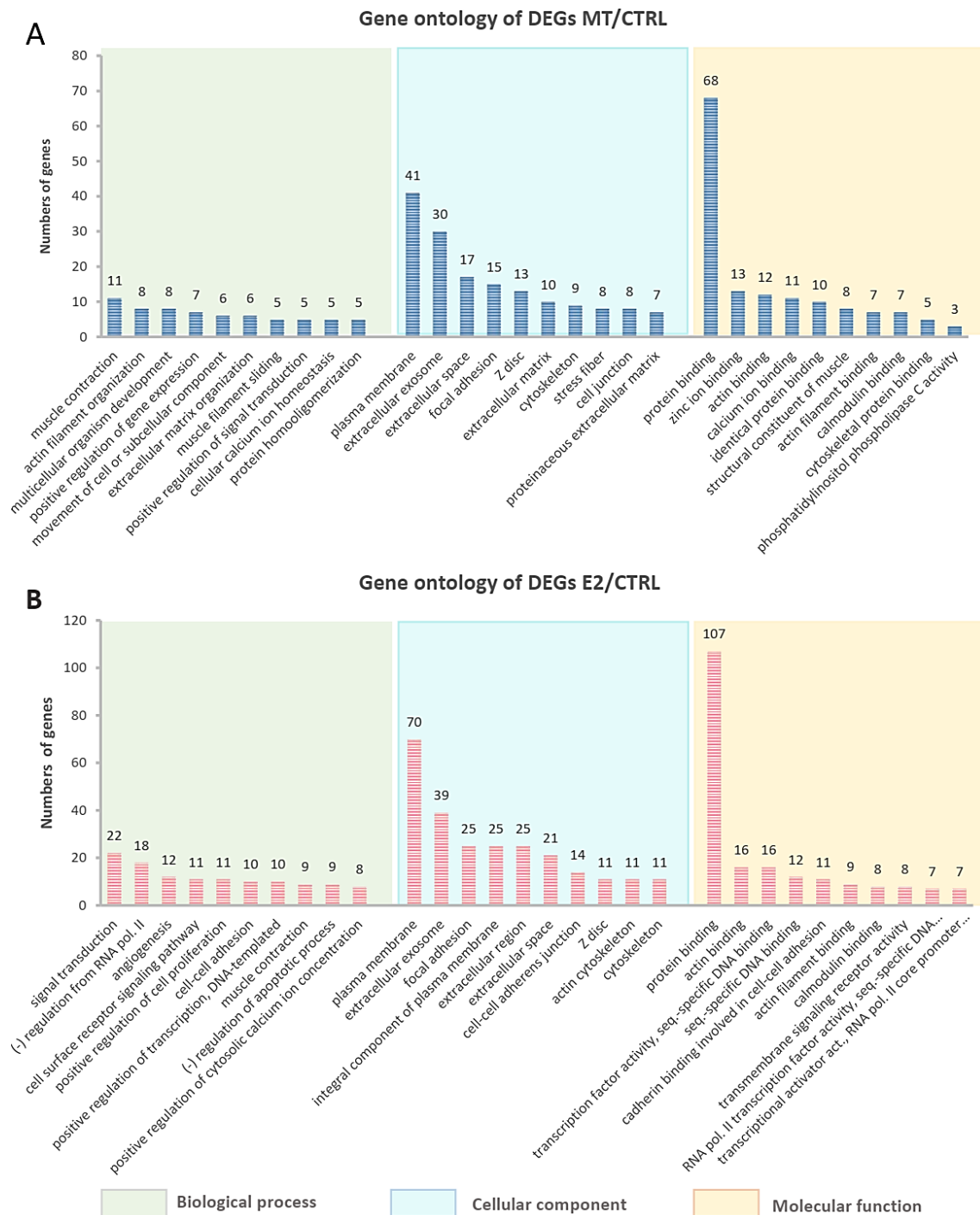
**Figura 13. A)** Análise de correspondência (CA). A inserção mostra os Eigenvalues. O valor de **d** fornece o tamanho da grade. **B)** Heat map mostrando os perfis de expressão gênica entre os grupos MT, Controle

(Control) e E2. Amostras agrupadas de acordo com seus padrões globais de expressão gênica. Cada coluna representa uma amostra biológica e cada linha um gene específico. (C) O diagrama de Venn mostra o número de genes diferencialmente expressos na comparação entre os grupos E2 vs Control, e entre MT vs Controle.

Para obter informação sobre o conjunto de GDEs foi conduzida uma análise ontológica dos genes (GO). Esta análise classifica os genes em termos que estão inseridos nas três categorias: processo biológico, função molecular e componente celular. Como resultado, obtivemos uma extensa lista de termos dos quais foram selecionados dez termos por categoria que continham o maior número de genes.

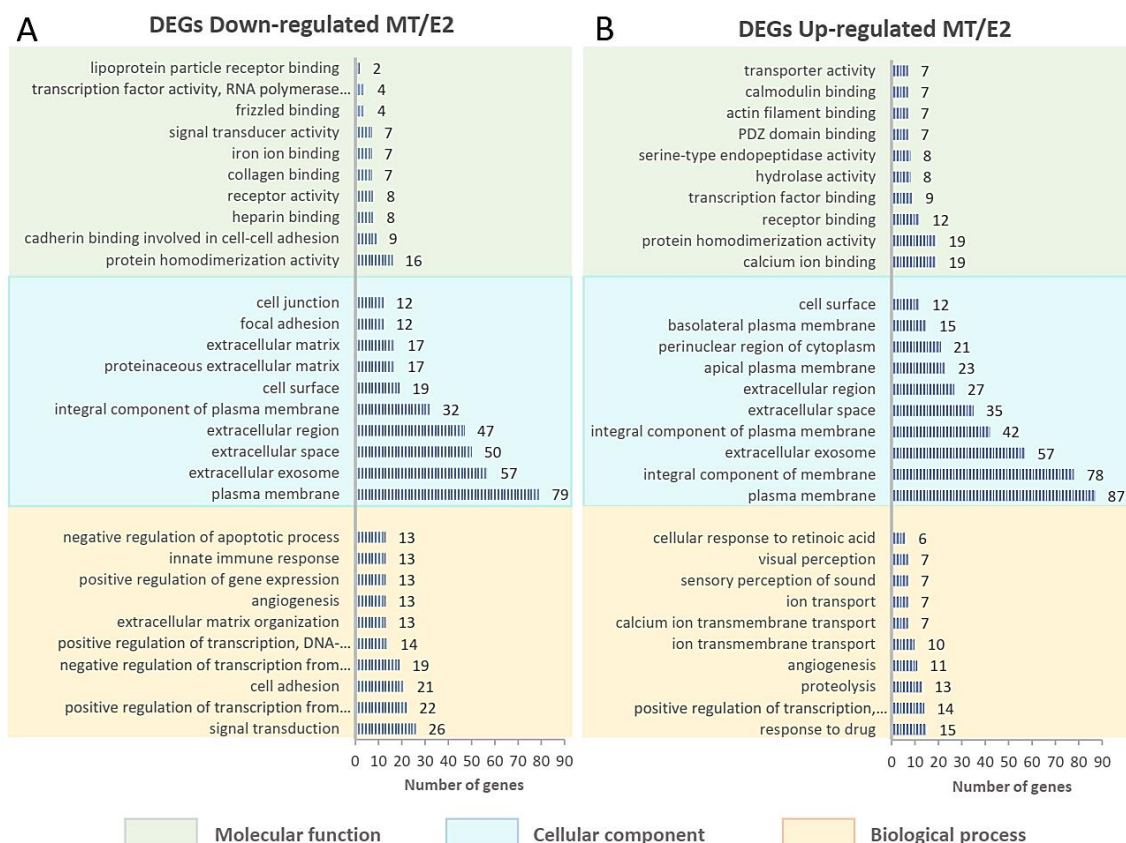
A análise de enriquecimento dos GDEs positivamente regulados no tratamento MT em relação ao Controle mostrou que os processos biológicos relacionados a organização estrutural do tecido foram estimulados como, matrix extracelular e organização filamento actina, bem como a regulação positiva de expressão gênica, entre outras (Figura 14A).

Já os GDEs que foram regulados positivamente no grupo tratado com E2 em relação ao Controle (Ctrl) foram relacionados aos processos biológicos de sinais de transdução, regulação negativa da RNA polimerase II, via de sinalização de receptor de superfície e regulação positiva da proliferação celular (Figura 14B). Além desses, genes relacionados ao processo de regulação positiva da proliferação celular e regulação negativa do processo apoptótico também estavam presentes (Figura 14B).



**Figura 14.** Análise de enriquecimento da ontologia dos GDEs positivamente. **(A)** 10 termos com maior número de GDEs da comparação entre os grupos MT vs Controle. **(B)** 10 termos com maior número de GDEs da comparação entre os grupos E2 vs Controle. Categorias estão representadas por cores: processo biológico (verde); componente celular (azul) e função molecular (alaranjado).

## GENE ONTOLOGY

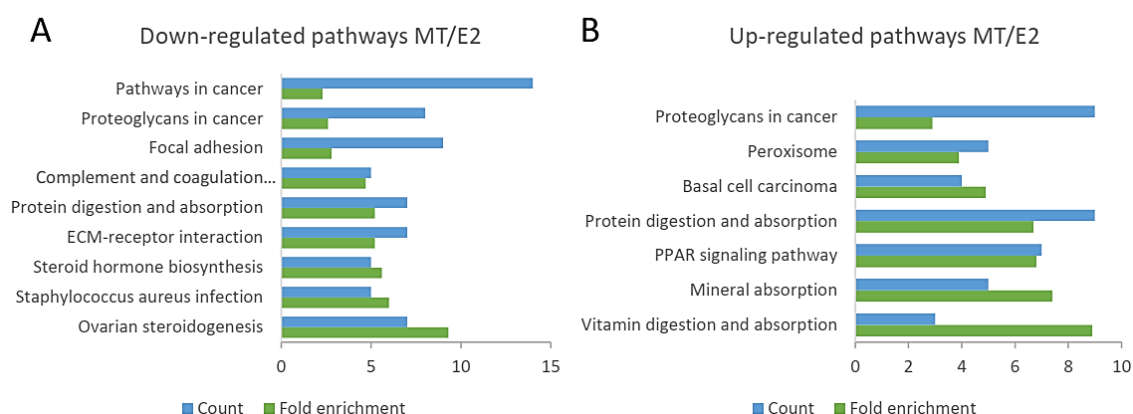


**Figura 15.** Análise de enriquecimento da ontologia dos GDEs. **(A)** 10 termos com maior número de genes regulados negativamente entre MT vs E2. **(B)** 10 termos com maior número de genes regulados positivamente entre MT vs E2. Categorias estão representadas por cores: função molecular (cinza); componente celular (azul) e processo biológico (alaranjado).

Análise de enriquecimento da ontologia dos GDEs comparado entre os grupos MT vs E2 mostrou que os transcritos relacionados aos termos sinais de transdução, regulação positiva da RNA polimerase II, regulação negativa da transcrição modelada por DNA, regulação positiva da expressão gênica, termos adesão celular e organização da matriz extracelular foram regulados negativamente (Figura 15A). Por outro lado, os transcritos que estavam mais expressos no grupo MT em relação ao E2 foram associados aos termos resposta a droga, angiogêneses e resposta celular ao ácido retinóico (Figura 15B).

Para obter informações sobre as possíveis vias que os GDEs poderiam estar relacionados, foi realizada uma análise de enriquecimento das vias considerando o valor de  $p < 0,05$ . A análise de enriquecimento de vias com base no banco de dados KEGG

revelou vias enriquecidas principalmente relacionadas esteroidogênese (Figura 16). Sendo assim, essas análises demonstraram nove vias reguladas negativamente no tratamento com MT em comparação com o tratamento E2 (Figura 16A). Dentre elas, a via que apresentou maior diferença significativa foi a via da esteroidogênese ovariana (Figura 16A). As outras vias afetadas foram da biossíntese de hormônio esteroide, receptor da matriz extracelular, adesão focal entre outras (Figura 16A). Já as vias reguladas positivamente em resposta ao MT comparado ao E2 foram as vias da sinalização PPAR (*Peroxisome proliferator- activated receptor*), peroxissomo, proteoglicanos em câncer entre outras (Figura 16B).

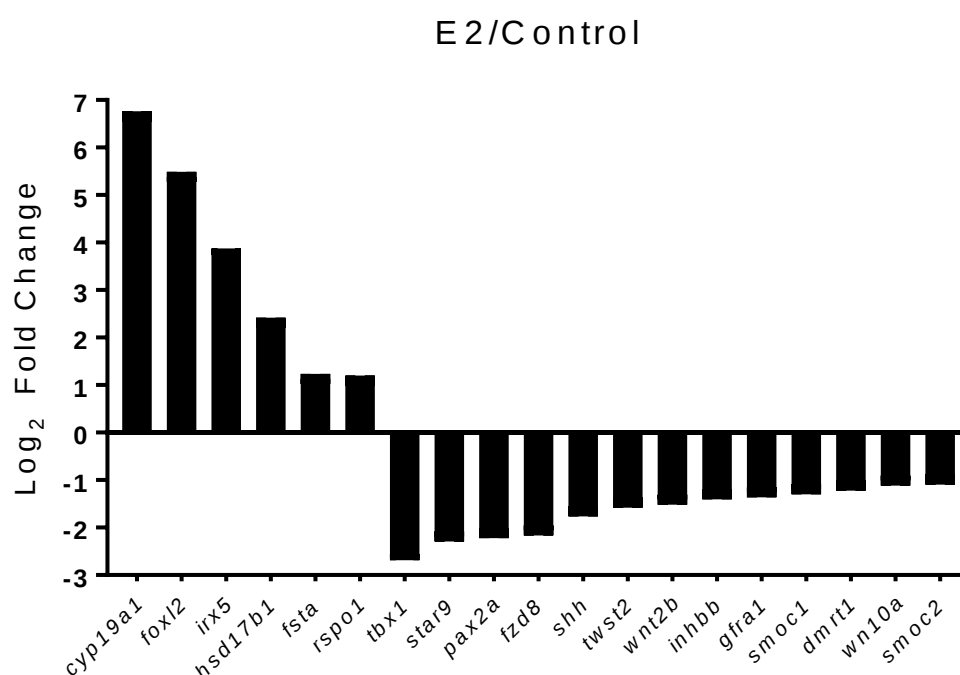


**Figura 16.** Análise de enriquecimento das vias comparando os GDEs entre os tratamentos MT vs E2.

De forma geral, vias relacionadas a síntese dos esteroides (esteroidogênese ovariana e biossíntese de hormônio esteroide), sinalização do Lh (hormônio luteinizante) e sinalização do Igf1 tiveram sua expressão suprimida em resposta ao tratamento MT em comparação com E2 (Figura 17). O GDEs que apresentaram associação com essas vias foram: *alox5*, *cyp1b1*, *cyp11a1*, *cyp17a1*, *cyp19a1*, *hsd17b1*, *igf1r* e *star*. Uma visão detalhada dessas vias pode ser observada na Figura 17.



*irx5* está sob o controle transcricional da via Wnt, que por sinal foi outra via que teve membros regulados positivamente, dentre eles *fst* e *rspond1* (Figura 18, Tabela 4). Por outro lado, genes implicados na determinação do sexo masculino ou no desenvolvimento do testículo, como *tbx1*, *dmrt1*, *inhbb*, *pax2a*, *shh* e *grfa-1*, *smoc 1* e *smoc 2* foram regulados negativamente no grupo tratado com E2 (Figura 18). Assim como, componentes de sinalização Wnt, *wnt2b* e *wnt10* e o receptor frizzled *fzd8* tiveram sua expressão diminuída (Figura 18).



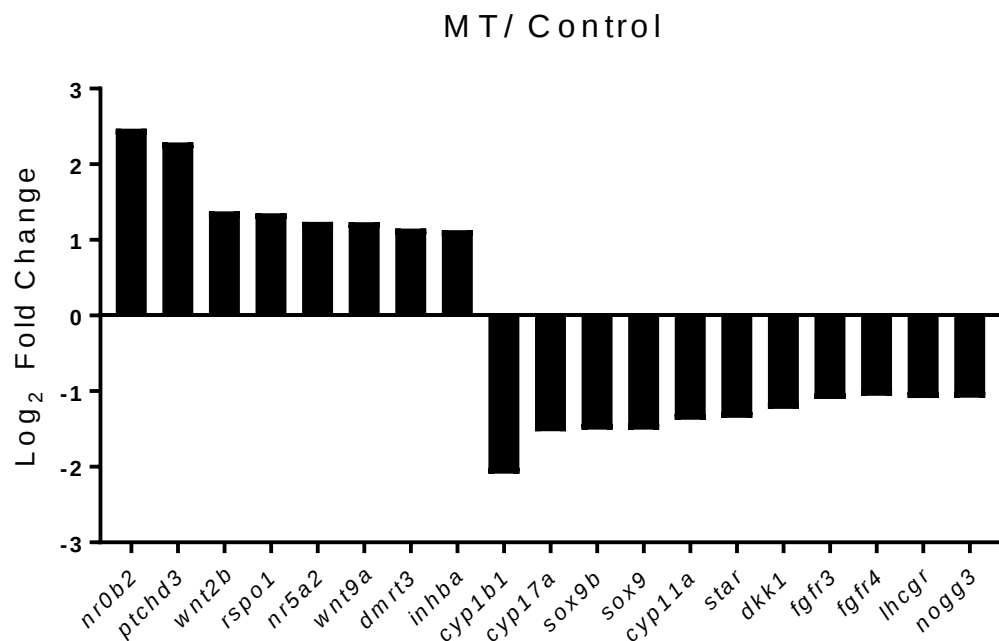
**Figura 18.** Análise comparativa dos genes diferencialmente expressos (GDEs) entre o grupo tratado com 17- $\beta$  Estradiol (E2) e grupo controle. Os genes foram considerados regulados positivamente ou regulados negativamente se  $\log_2$  (Fold Change) > 1 e  $\log_2$  (Fold Change) < -1, respectivamente.  $p < 0,05$ .

### 5.7. Análise dos GDEs em resposta ao tratamento MT

O tratamento com MT estimulou a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento e diferenciação gonadal masculina, dentre eles o fator de transcrição *dmrt3* (*Doublesex* e *mab-3*) e o receptores nucleares *nr5a2* e *nr0b2* (Figura 19, Tabela 4). Também encontramos componentes de sinalização Wnt regulados positivamente, *wnt2b*,

*wnt9a* e *rspo1* (Figura 19). Outros genes que apresentaram aumento na expressão foram o receptor *pct3* (membro da família Patched) e a subunidade Beta A da inibina, *inhba*.

Em contraste, alguns genes envolvidos na biossíntese do hormônio esteroide (*cyp11b1*, *cyp11a1*, *cyp17a1*, *star* e *lhcg*) foram regulados negativamente no grupo MT (Figura 19). Da mesma forma, o antagonista da via de sinalização Wnt, *dkk1* (Dickkopf homolog 1), teve sua expressão diminuída (Figura 19). Os genes *sox9* e *sox9b* foram menos expressos, assim como os receptores do fator de crescimento de fibroblastos 3 e 4 (*fgfr3* e *fgfr4*) e o *nog3*, gene inibidor de membros da família TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*) (Figura 19).



**Figura 19.** Análise comparativa de genes diferencialmente expressos (GDEs) entre 17 $\alpha$ -Metiltestosterona (MT) e grupo controle. Os genes foram considerados regulados positivamente ou regulados negativamente se log<sub>2</sub> (Fold Change) > 1 e log<sub>2</sub> (Fold Change) < -1, respectivamente. p < 0,05.

### 5.8. GDEs ente o grupo tratado com MT vs grupo tratado com E2

O tratamento com MT em comparação com E2 resultou em um total de 335 genes regulados positivamente e 302 genes regulados negativamente (Figura 20). Essa comparação revelou um número maior de GDEs entre os grupos, mostrando assim que os

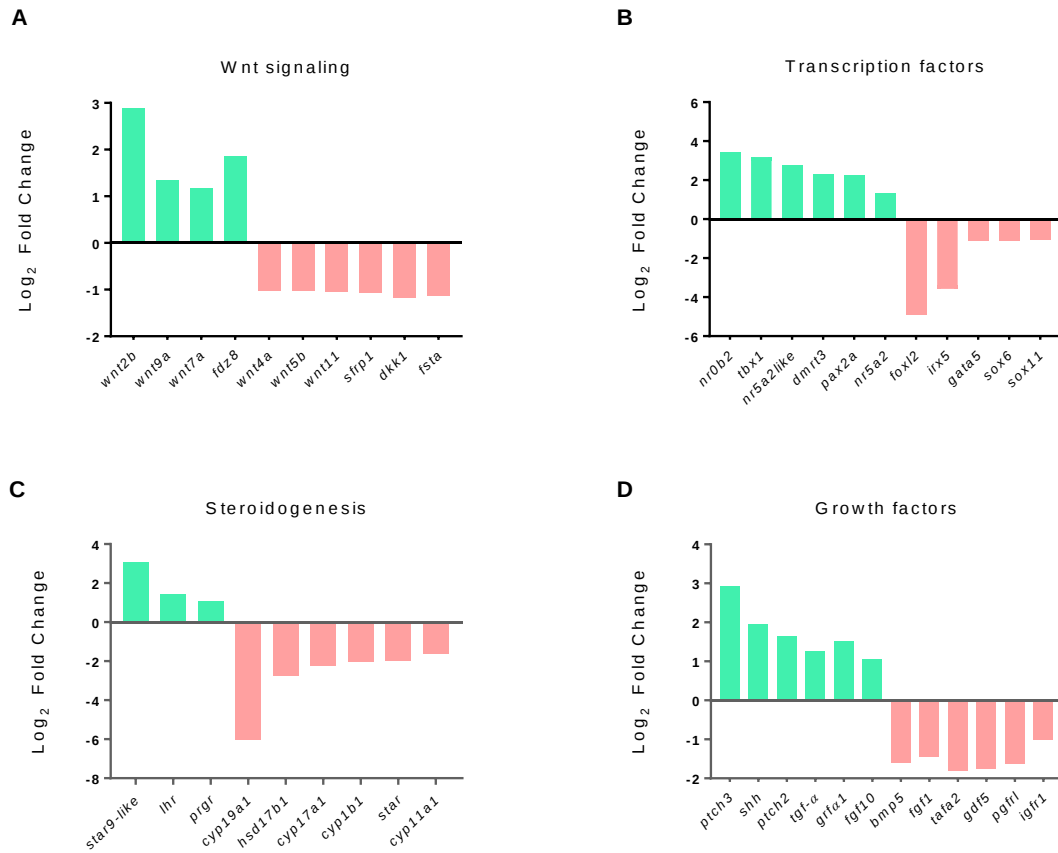
grupos tratados exibem perfis transcriptômicos mais distintos entre si do que quando comparados ao controle.

A via de sinalização Wnt apresentou genes que tiveram sua expressão tanto estimulada (*wnt2b*, *wnt9a* e *wnt7a*) quanto reprimida (*wnt4a*, *wnt5b*, *wnt11*, *sfrp1*, *dkk1*, *fst*) (Figura 20A). Os fatores de transcrição *dmrt3*, *nr5a2*, *nr5a2like*, *nr0b2* foram mais expressos (Figura 20B). Já os fatores de transcrição *foxl2* e *irx5* e outros ainda com os mecanismos não elucidados como *gata5*, *sox6* e *sox11* foram menos expressos (Figura 20B).

Vários componentes da via esteroidogênica tiveram sua expressão diminuída, principalmente os genes da via da esteroidogênese ovariana (*cyp19a1*, *hsd17b1*, *cyp17a1*, *cyp11b1*, *star*, *cyp11a1*) (Figura 20C). Por outro lado, genes que estão associados de forma indireta com a via tiveram um aumento na expressão como, *star9-like*, receptor de hormônio luteinizante (*lhr*), citocromo P450 família 2 membros 1 e 2 (*cyp2j1*, *cyp2j2*) e receptor de progesterona (*prgr*) (Figura 20C).

Nossos dados também revelaram que o tratamento com MT aumentou os níveis de expressão dos fatores de crescimento da via de sinalização *Hedgehog* (*ptch3*, *shh*, *ptch2*) (Figura 20D) assim como, estimulou a expressão do TGF- $\alpha$ , membro da família EGF (*Epidermal Growth Factor*) e do GFR $\alpha$ , receptor da família GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Figura 20D). Já em relação aos fatores de crescimento que tiveram sua expressão diminuída estão o *fgf1*, *igfr1* *pgfrl*, *gdf5* e *tafa2* (Figura 20D).

## MT/E2



**Figura 20.** Genes diferencialmente expressos (GDEs) entre os grupos 17 $\alpha$ -Metiltestosterona (MT) e 17 $\beta$ -Estradiol (E2). ( $p \leq 0,05$ ,  $|\log_2 FC| > 1$ ).

### 5.9. Visão global dos genes envolvidos na diferenciação sexual e gametogênese

Para ter uma visão global dos genes já descritos que estão relacionados a determinação, diferenciação ou manutenção do sexo em vertebrados, listamos uma tabela incluindo alguns desses genes. A Tabela 4 inclui os genes que foram considerados diferencialmente expressos, assim como aqueles que não foram considerados, ou seja, não apresentaram valores de acordo com os parâmetros  $\log_2 FC > 1$  ou  $\log_2 FC < -1$ ,  $p < 0,05$ .

**Tabela 4 - Padrão de expressão de genes relacionados a determinação/diferenciação sexual e gametogênese**

| Gene ID                               | Gene name           | Gene description                                                                           | Log2 Fold Change |            |       |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------|-------|
| Transcription factors                 |                     |                                                                                            | E2/Control       | MT/Control | MT/E2 |
| TR_DN463_c1_g2                        | <i>wt1</i>          | Wilms tumor protein 1a                                                                     | 0,35             | -0,36      | -0,72 |
| TR_DN29653_c0_g1                      | <i>foxl2</i>        | Forkhead box L2                                                                            | 5,49             | 0,62       | -4,88 |
| TR_DN39565_c0_g1                      | <i>foxl3</i>        | Forkhead box L3                                                                            | 0,69             | —          | —     |
| TR_DN23901_c0_g1                      | <i>gata4</i>        | Gata binding protein 4                                                                     | —                | —          | —     |
| TR_DN33279_c0_g1                      | <i>gata5</i>        | Gata binding protein 5                                                                     | 0,75             | —          | -1,07 |
| TR_DN18189_c0_g1                      | <i>dmrt1</i>        | Doublesex- and mab-3-related transcription factor 1                                        | -1,22            | —          | 0,76  |
| TR_DN31878_c0_g1                      | <i>dmrt3</i>        | Doublesex- and mab-3-related transcription factor 3                                        | —                | 1,15       | 2,32  |
| TR_DN6183_c0_g1                       | <i>sox8</i>         | SRY-box transcription factor 8                                                             | —                | —          | -0,68 |
| TR_DN312_c0_g1                        | <i>sox9-like</i>    | SRY-box transcription factor 9-like                                                        | -0,67            | -1,51      | -0,85 |
| TR_DN35942_c0_g1                      | <i>sox9</i>         | SRY-box transcription factor 9                                                             | -0,83            | -1,51      | -0,69 |
| TR_DN8591_c0_g1                       | <i>sox10</i>        | SRY-box transcription factor 10                                                            | —                | 1,08       | —     |
| TR_DN30448_c0_g1                      | <i>sox11</i>        | SRY-box transcription factor 11                                                            | —                | —          | -1,06 |
| TR_DN37824_c0_g1                      | <i>dax1</i>         | Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 | —                | —          | —     |
| TR_DN27893_c0_g1                      | <i>nr0b2</i>        | Nuclear receptor subfamily 0 group B member 2                                              | —                | —          | -1,12 |
| TR_DN30667_c0_g1                      | <i>nr0b2-like</i>   | Nuclear receptor subfamily 0 group B member 2-like                                         | —                | 2,47       | 3,44  |
| TR_DN3283_c0_g1                       | <i>sf1-like</i>     | Steroidogenic factor 1 like                                                                | —                | -0,45      | -0,66 |
| TR_DN30034_c0_g1                      | <i>sf-1</i>         | Steroidogenic factor 1                                                                     | —                | —          | -0,64 |
| TR_DN38452_c0_g1                      | <i>nr5a2</i>        | Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2                                              | —                | 1,24       | 1,30  |
| TR_DN37032_c0_g1                      | <i>nr5a2-like</i>   | Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2-like                                         | —                | —          | 2,76  |
| TR_DN11058_c0_g1                      | <i>pax2a</i>        | Paired box 2                                                                               | -2,22            | —          | 2,25  |
| Growth factors                        |                     |                                                                                            |                  |            |       |
| TR_DN16455_c0_g1                      | <i>fgf1</i>         | Fibroblast growth factor 1                                                                 | —                | -0,85      | -1,45 |
| TR_DN21314_c0_g1                      | <i>fgf7</i>         | Fibroblast growth factor 7                                                                 | 1,01             | —          | -0,68 |
| TR_DN4019_c0_g1                       | <i>fgf10</i>        | Fibroblast growth factor 10                                                                | —                | 0,73       | 1,05  |
| TR_DN9380_c1_g1                       | <i>fgf20</i>        | Fibroblast growth factor 20                                                                | —                | —          | 0,98  |
| TR_DN331_c0_g2                        | <i>fgfr2</i>        | Fibroblast growth factor receptor 2                                                        | 0,56             | 0,54       | —     |
| TR_DN9807_c0_g1                       | <i>fgfr3</i>        | Fibroblast growth factor receptor 3                                                        | —                | -1,10      | —     |
| TR_DN8783_c0_g1                       | <i>fgfr4</i>        | Fibroblast growth factor receptor 4                                                        | —                | —          | -1,09 |
| TR_DN2408_c6_g1                       | <i>fgfr4</i>        | Fibroblast growth factor receptor 4                                                        | —                | -1,06      | -0,63 |
| TR_DN39207_c0_g1                      | <i>pdgfa</i>        | Platelet derived growth factor subunit alpha                                               | —                | —          | -0,97 |
| TR_DN280_c1_g1                        | <i>pdgfb</i>        | Platelet derived growth factor subunit beta                                                | 0,61             | —          | —     |
| TR_DN2469_c0_g1                       | <i>szrd1/amh</i>    | Anti-Müllerian hormone                                                                     | —                | -0,94      | -0,52 |
| TR_DN35835_c0_g1                      | <i>cxcr4</i>        | ©-X-C Motif chemokine receptor 4                                                           | 0,78             | —          | —     |
| TR_DN35395_c0_g1                      | <i>sdf1</i>         | Stromal cell-derived factor 1                                                              | —                | —          | —     |
| TR_DN13785_c0_g1                      | <i>shh</i>          | Sonic Hedgehog                                                                             | -1,76            | —          | 1,95  |
| TR_DN27739_c0_g1                      | <i>ptch2</i>        | Patched 2                                                                                  | —                | —          | 1,66  |
| TR_DN32028_c0_g1                      | <i>ptch3</i>        | Patched 3                                                                                  | —                | 2,29       | 2,94  |
| TR_DN2190_c2_g1                       | <i>gdf5</i>         | Growth and differentiation factor 5                                                        | 1,40             | —          | -1,74 |
| Rspo1/Wnt4/ $\beta$ -catenin pathway  |                     |                                                                                            |                  |            |       |
| TR_DN455_c0_g1                        | <i>ctnb1</i>        | Catenin beta-1                                                                             | —                | —          | —     |
| TR_DN2938_c0_g1                       | <i>ctna2</i>        | Catenin alpha-2                                                                            | -0,52            | —          | 0,83  |
| TR_DN721_c2_g1                        | <i>wnt4a</i>        | Wingless-type MMTV integration site family, member 4                                       | 0,93             | —          | -1,01 |
| TR_DN29863_c0_g1                      | <i>rspo1</i>        | ©-Spondin 1                                                                                | 1,20             | 1,35       | —     |
| TR_DN16900_c0_g1                      | <i>fsta</i>         | Follistatin                                                                                | 1,23             | —          | -1,12 |
| Steroidogenesis and hormone receptors |                     |                                                                                            |                  |            |       |
| TR_DN36186_c0_g1                      | <i>star</i>         | Steroidogenic acute regulatory protein                                                     | —                | -1,35      | -1,97 |
| TR_DN23935_c0_g1                      | <i>cp11a</i>        | Cytochrome P450 family 11 subfamily A                                                      | —                | -1,38      | -1,59 |
| TR_DN13593_c0_g1                      | <i>cyp17a</i>       | Cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1                                             | 0,69             | -1,53      | -2,23 |
| TR_DN17335_c0_g1                      | <i>dhb1/hsd17b1</i> | 17-Beta hydroxysteroid dehydrogenase 1                                                     | 2,42             | -0,29      | -2,72 |
| TR_DN39035_c0_g1                      | <i>cyp19a</i>       | Aromatase                                                                                  | 6,76             | —          | -6,01 |
| TR_DN140_c0_g1                        | <i>esrb</i>         | Estrogen receptor beta                                                                     | 0,87             | 0,72       | —     |
| TR_DN2175_c0_g1                       | <i>esra</i>         | Estrogen receptor alpha                                                                    | —                | —          | —     |
| Retinoic acid pathway                 |                     |                                                                                            |                  |            |       |
| TR_DN28040_c0_g1                      | <i>cyp26b</i>       | Cytochrome P450 family 26 subfamily B                                                      | —                | —          | —     |
| TR_DN30560_c1_g1                      | <i>raraa</i>        | Retinoic acid receptor alpha                                                               | 0,67             | -0,78      | -1,46 |
| TR_DN26019_c0_g1                      | <i>al1a1</i>        | Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1                                                  | -0,89            | —          | 0,70  |
| TR_DN1784_c0_g1                       | <i>al1a2</i>        | Aldehyde dehydrogenase 1 family member A2                                                  | —                | -0,57      | -0,80 |
| TR_DN230_c1_g2                        | <i>al1a3</i>        | Aldehyde dehydrogenase 1 family member A3                                                  | —                | -0,93      | -1,02 |
| TR_DN26685_c0_g1                      | <i>stra6</i>        | Stimulated by acid retinoic 6                                                              | —                | —          | —     |

(-) Não diferenciamente significativos,  $p > 0,05$

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito de esteroides sexuais no desenvolvimento gonadal de *C.undecimalis* quanto à expressão gênica de kisspeptina encefálica e seus receptores, a morfologia gonadal e nos perfis transcriptômicos (RNA-seq) gonadais.

A análise filogenética das sequências codificantes para o gene ligante *kiss1*, formou grupamento com Perciformes e Scorpaeniformes, porém as sequências do ligante são mais variadas, o que resultou em uma árvore menos consistente e robusta quando comparada a árvore do receptor de kisspeptina. Neste trabalho até o momento ainda não conseguimos isolar a sequência do *kiss2* *C. undecimalis*. A análise do receptor de kisspeptina de *C. undecimalis* mostrou a presença de duas cópias, *kissr2* e *kissr3*, posicionadas em clados distintos formando grupamentos irmãos com outros Perciformes, Pleuronectiformes e Scorpaeniformes.

Quanto à expressão gênica do sistema kisspeptina, os animais que receberam MT apresentaram maior expressão de *kiss1* no período de coleta A1 em relação aos demais grupos. Esse resultado sugere que os neurônios kisspeptinérgicos foram sensíveis a esse esteroide sexual. O tratamento com E2 por outro lado, não alterou o nível de expressão do *kiss1* no período A1, porém no período A2, ambos os tratamentos (andrógeno e estrógeno) resultaram em níveis elevados dos transcritos de *kiss1* em relação ao controle. Essa ação dos esteroides nos neurônios kisspeptinérgicos está bem estabelecida em mamíferos. Em camundongos, por exemplo, a testosterona e o estradiol têm um efeito estimulatório nos níveis de *kiss1* nos neurônios do núcleo AVPV (SMITH; CUNNINGHAM; RISSMAN; CLIFTON *et al.*, 2005; SMITH; DUNGAN; STOLL; GOTTSCH *et al.*, 2005).

Nos teleósteos, em medaka, os níveis de expressão do ligante *kiss1* estão correlacionados com as mudanças dos estágios reprodutivos, sugerindo assim a regulação

do *kiss1* via esteroides sexuais (KANDA; AKAZOME; MATSUNAGA; YAMAMOTO *et al.*, 2008). Ainda em medaka, fêmeas ovariectomizadas apresentaram regulação negativa para *kiss1* que era retomada quando administrado estrógeno. Neste mesmo trabalho foi identificado a expressão do receptor de estrógeno nos neurônios que expressam *kiss1* (MITANI; KANDA; AKAZOME; ZEMPO *et al.*, 2010). Zebrafish juvenis expostos durante 7 dias ao estrógeno apresentaram um aumento nos níveis de RNAm *kiss1* (SERVILI; LE PAGE; LEPRINCE; CARATY *et al.*, 2011).

Desta forma, é possível sugerir que o aumento do ligante *kiss1* de *C. undecimalis* possa ter sido em decorrência do tratamento com os esteroides sexuais. Para estabelecermos uma possível relação entre esteroide sexual, *kiss1* e estágio reprodutivo, abordaremos a seguir os aspectos da morfologia gonadal dos diferentes tratamentos.

No presente estudo, antes do início do período experimental os animais apresentavam tecido gonadal formado por algumas células germinativas isoladas, o qual sugerimos ser uma gônada indiferenciada. O *C. undecimalis* é uma espécie protândrica, ou seja, todos os indivíduos têm sua primeira maturação sexual como macho (TAYLOR *et al.*, 2000), logo, espera-se visualizar no desenvolvimento gonadal do grupo controle a formação de testículos. Durante o período das três coletas (A1, A2 e A3), o grupo controle apresentava inicialmente gônada filiforme com poucas camadas de células somáticas e algumas células germinativas isoladas que ao longo do tempo, essas células formaram cistos localizados na periferia no tecido. O grupo tratado com MT desde a primeira coleta A1 apresentou gônada com desenvolvimento avançado comparado ao controle. O tecido gonadal era formado por várias camadas de células somáticas e muitas células germinativas organizadas em cistos majoritariamente localizados na periferia do tecido. E por fim, o grupo E2 no qual o tecido gonadal era constituído em sua maior parte por

tecido conjuntivo, células germinativas e somáticas que estavam localizadas na região central do tecido.

De acordo com Mazzoni *et al* (2014) é possível distinguir precocemente uma gônada feminina de uma masculina com base na organização das células germinativas e somáticas no tecido gonadal. Em estudo realizado com *Percormorpha*, em uma espécie gonocorística, as gônadas indiferenciadas dos animais que supostamente eram fêmeas, apresentavam células germinativas distribuídas na região central da gônada enquanto que os machos apresentavam células germinativas concentradas na região periférica, formando estruturas semelhantes à ácinos (MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2014). Além disso, a região dorsal da gônada masculina apresenta uma alta taxa proliferativa de células somáticas que darão origem ao ducto espermático (MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2014). Dessa forma, apesar dos animais ainda não apresentarem células germinativas avançadas para afirmarmos quais indivíduos são machos ou fêmeas, podemos inferir de acordo com a morfologia do desenvolvimento gonadal descrita por Mazzoni *et al* (2014), que o grupo controle e o tratado com MT, apresentam gônadas com características de testículo, enquanto que no grupo tratado E2, as gônadas possuem diferenciação semelhante à ovário.

Considerando que a entrada na puberdade dos teleósteos é caracterizada pela presença dos espermátócitos nos machos e o início da vitelogênese nas fêmeas (TARANGER; CARRILLO; SCHULZ; FONTAINE *et al.*, 2010), a relação *kiss1* e entrada na puberdade não se aplica neste estudo, pois, os tipos celulares espermátócitos e oócito em vitelogênese, não estavam presentes no tecido gonadal de *C. undecimalis*.

O aumento de *kiss1* pode estar relacionado com a diferenciação precoce do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal masculino e consequentemente com a proliferação das células germinativas, embora o receptor não tenha alterado. Assim como foi descrito em

fêmeas masculinizadas, submetidas altas temperaturas, de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, porém, neste estudo o ligante *kiss2* foi mais expresso e sugerido como candidato na relação da diferenciação do eixo cérebro-hipófise no desenvolvimento masculino (TOVAR BOHÓRQUEZ; MECHALY; HUGHES; CAMPANELLA *et al.*, 2017).

Sendo assim, com esses dados preliminares, é possível inferir que o aumento dos transcritos primários de *kiss1* no tratamento com MT em A1 possam estar relacionados com o processo de diferenciação e desenvolvimento gonadal mais avançado nesse grupo.

### 6.1. Análise do transcriptoma

Este estudo apresentou de forma inédita o *de novo* transcriptoma gonadal de *C. undecimalis*. A montagem do transcriptoma apresentou uma alta precisão e completude dos quais 4584 ortólogos de cópia única pesquisados, 3926 foram recuperados completamente, esse índice de 85,6% é comparável a outros estudos de análise de transcriptoma *de novo*, onde por exemplo, o índice de completude variou de 76% (*Coregonus lavaretus*) a 79% (*Salmo salar*) (CARRUTHERS, *et al.*, 2018). A avaliação dos perfis transcriptômicos das gônadas entre os tratamentos revelou genes diferencialmente expressos relacionados a diferenciação sexual e desenvolvimento gonadal.

### 6.2. Estradiol (E2) ativa genes da via de diferenciação feminina

A análise do perfil transcriptômico do grupo tratado com E2 em comparação com o grupo controle mostrou que os genes relacionados à diferenciação ovariana, *cyp19a1* e *foxl2*, foram os genes mais diferencialmente expresso. O *cyp19a1*, aromatase gonadal, codifica uma enzima responsável pela aromatização de andrógenos em estrógenos

(SIMPSON; MAHENDROO; MEANS; KILGORE *et al.*, 1994). Nos teleósteos, estudos mostram que o estrógeno tem um papel importante na diferenciação ovariana (BLÁZQUEZ; GONZÁLEZ; PAPADAKI; MYLONAS *et al.*, 2008; GUIGUEN; BAROILLER; RICORDEL; ISEKI *et al.*, 1999). Por exemplo, o uso de inibidores da aromatase resulta na reversão sexual completa de espécies gonocóricas, como *Japanese flounder* (KITANO; TAKAMUNE; NAGAHAMA; ABE, 2000) e em espécie protândrica, *Acanthopagrus schlegeli*, impede a mudança de sexo de macho para fêmea, (LEE; YUEH; DU; SUN *et al.*, 2002). Esses mesmos resultados são descritos em *Danio rerio* deficientes para o gene *cyp19a1*, onde todos os mutantes se desenvolveram como machos (LAU; ZHANG; QIN; GE, 2016). Em *Thalassoma bifasciatu*, espécie protogínica, a troca de sexo de fêmea para macho é marcada pela repressão da expressão da *cyp19a1* (TODD; ORTEGA-RECALDE; LIU; LAMM *et al.*, 2019).

O segundo gene com maior expressão diferencial no grupo que recebeu dieta contendo E2 foi o *foxl2*. O *foxl2* é um fator de transcrição membro da família dos genes Fox que apresentam domínio *forkhead*, e sua função está relacionada tanto a diferenciação ovariana quanto a manutenção e desenvolvimento dos folículos em vertebrados (BOULANGER; PANNETIER; GALL; ALLAIS-BONNET *et al.*, 2014; LUO; GU; LI; GONG, 2020; YAMAGUCHI; YAMAGUCHI; HIRAI; KITANO, 2007). Nos teleósteos, há uma correlação positiva entre a expressão dos genes *cyp19a1* e *foxl2* (BARON; COCQUET; XIA; FELLOUS *et al.*, 2004; WU; TOMY; NAKAMURA; CHANG, 2008). O *foxl2* atua como um fator de regulação transcricional do *cyp19a1* (WANG; KOBAYASHI; ZHOU; PAUL-PRASANTH *et al.*, 2007; YAMAGUCHI; YAMAGUCHI; HIRAI; KITANO, 2007). A perda da função do *foxl2* em fêmeas causa reversão sexual produzindo indivíduos do sexo masculino (ZHANG, *et al.*, 2017).

Além desses genes, os componentes da via Rspo1/Wnt/ $\beta$ -catenina que estão envolvidos na diferenciação ovariana, também foram regulados positivamente. Dentre eles, *rspo1*, *wnt4a* e *fst* apresentaram-se mais expressos no grupo tratado com E2 em relação ao controle. Em mamíferos, *Rspo1* e *Wnt4* atuam na estabilização da  $\beta$ -catenina (*ctnnb1*), que se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF promovendo a ativação de genes da via de diferenciação ovariana por exemplo, a folistatina (*fst*) assim como a inativação de genes da via de diferenciação testicular, tal como *sox9* (MAATOUK; DINAPOLI; ALVERS; PARKER *et al.*, 2008; YAO; MATZUK; JORGEZ; MENKE *et al.*, 2004).

Em teleósteos, a *rspo1* apresenta um padrão de expressão dimórfico durante a diferenciação sexual, sendo mais expresso nas fêmeas quando comparado aos machos em zebrafish, medaka e tilápia (ZHANG; LI; SUN; LIU *et al.*, 2011); (WU; YANG; LUO; WANG *et al.*, 2016; ZHOU; CHARKRABORTY; YU; WU *et al.*, 2012). Quando superexpresso em medaka macho (XY), *rspo1* é capaz de ativar a via Rspo1/Wnt/ $\beta$ -catenina levando a supressão dos genes masculinos (*dmy*, *gsdf*, *sox9a2* e *dmrt1*), bem como a diferenciação testicular, e ao aumento da expressão dos genes femininos (*cyp19a1a* e *foxl2*), resultando em fêmeas férteis (ZHOU; CHARKRABORTY; ZHOU; MOHAPATRA *et al.*, 2016). Apesar das evidências mostrarem *rspo1* como um gene pró-fêmea, o *knockdown* de *rspo1* em tilápia machos (XY) diminui a expressão dos genes *cyp11c*, *igf3*, *amh* e dos níveis de 11-KT resultando no atraso da espermatogênese (WU; YANG; LUO; WANG *et al.*, 2016). Em *Thalassoma bifasciatum*, durante a transição do sexo de fêmea para macho, *rspo1* mostrou expressão crescente ao longo do desenvolvimento do testículo (TODD; ORTEGA-RECALDE; LIU; LAMM *et al.*, 2019). Nesse estudo, a *rspo1* foi mais expressa no grupo tratado com E2 quando comparado ao controle, porém a comparação entre os grupos E2 e MT não apresentou diferença,

sugerindo assim um possível papel de *rspo1* no desenvolvimento gonadal de ambos os sexos.

Quanto ao *Wnt4*, em zebrafish, a perda de função do gene ortólogo de mamífero *Wnt4*, *wnt4a*, resultou no aumento da proporção de machos na população e afetou, em ambos os sexos, o desenvolvimento do ducto reprodutivo gerando assim indivíduos estéreis, apesar da sua capacidade de produzir oócitos e espermatozoides férteis (KOSSACK; HIGH; HOPTON; YAN *et al.*, 2019). No peixe protândrico black porgy, o *wnt4a* está associado ao desenvolvimento inicial do ovário (proliferação de oogônia) durante a mudança de sexo de forma natural e induzida (WU; CHANG, 2009).

Outro gene que teve sua expressão aumentada pelo E2 foi o *irx5*. *Irx5* é membro da família de genes *Iroquois homeobox* constituída por fatores de transcrição altamente conservados que especificam a identidade de partes precisas do corpo através da regulação espacial e temporal do gene alvo (CAVODEASSI; MODOLELL; GÓMEZ-SKARMETA, 2001). Em *Xenopus laevis*, o *irx5* modula a migração das células germinativas através da repressão do *sdf-1* (BONNARD; STROBL; SHBOUL; LEE *et al.*, 2012). Em mamíferos, *irx5* se expressa nos ninhos formados por células germinativas femininas, e ao longo do desenvolvimento, sua expressão é translocada para as células da granulosa, enquanto que nos testículos, o *irx5* não é expresso (FU; OBERHOLTZER; BAGHERI-FAM; RASTETTER *et al.*, 2018). É proposto que o *irx5* seja necessário para manter as redes de comunicação entre células germinativas e somáticas, uma vez que a perda da sua função resulta no comprometimento das interações destas células levando à morte do oócito, gerando assim fêmeas subférteis (FU; OBERHOLTZER; BAGHERI-FAM; RASTETTER *et al.*, 2018).

Recentemente, foi demonstrado que o *irx5* está sob controle transcricional da via Wnt/Beta-catenina, e que nos machos a transcrição é suprimida devido a uma modificação

epigenética das regiões contendo as sequências que promovem a expressão do locus *IrxB* (KOTH; GARCIA-MORENO; NOVAK; HOLTHUSEN *et al.*, 2020). Essa informação justificaria a regulação sexualmente dimórfica do *irx5* entre machos e fêmeas. Estudo realizado com esturjão durante a diferenciação sexual mostrou que os genes da família *irx* foram mais expressos durante o desenvolvimento ovariano, destacando assim um potencial papel dos genes *irx* na diferenciação sexual de peixes em um nível gonadal (VIZZIANO-CANTONNET; LASALLE; DI LANDRO; KLOPP *et al.*, 2018).

### 6.3. Metiltestosterona ativa genes pró-machos

Nossos dados revelaram que o tratamento com MT aumentou os níveis de transcrição dos fatores de crescimento relacionados à sinalização de *hedgehog*: *ptch3*, *shh* e *ptch2*. Em mamíferos a via *hedgehog* está relacionada com a diferenciação das células de Leydig (CLARK; GARLAND; RUSSELL, 2000).

Outro gene que teve a expressão aumentada no grupo tratado com MT em relação ao controle foi o *dmrt3*. Os fatores de transcrição relacionados a Doublesex e Mab-3 (*Dmrt*) são caracterizados pelo domínio DM (*Doublesex and mab-3*) o qual se liga a sequências similares no DNA. O *dmrt3* é considerado um gene pró-macho, e sua expressão é mais elevada nas gônadas masculinas do que nas femininas de zebrafish e medaka (LI; ZHOU; GUO; SHANG *et al.*, 2008; WINKLER; HORNUNG; KONDO; NEUNER *et al.*, 2004). Em peixes e mamíferos, é proposto que *Dmrt3* funciona cooperativamente com *Dmrt1* após a diferenciação gonadal (YAMAGUCHI; LEE; FUJIMOTO; KADOMURA *et al.*, 2006). O *dmrt1* encontrado aqui foi mais expresso no grupo Controle em relação ao E2 e não houve diferença entre MT e Controle. Em algumas espécies como *Oryzias latipes*, *Xenopus laevis* e *Cynoglossus semilaevis* o *dmrt1*, atua como o “master” gene da determinação do sexo masculino (CUI; LIU; WANG; WANG

*et al.*, 2017; SMITH; ROESZLER; OHNESORG; CUMMINS *et al.*, 2009). Em mamíferos, o *Dmrt1* é necessário para a diferenciação de células somáticas e células germinativas da gônada masculina (MATSON; MURPHY; SARVER; GRISWOLD *et al.*, 2011); (MINKINA; MATSON; LINDEMAN; GHYSELINCK *et al.*, 2014).

O fator de transcrição *tbx1* (*T-box transcription factor*) foi um dos genes mais expressos no grupo tratado com MT em relação ao grupo tratado com E2. O *tbx1* é um membro da família de genes T-box que desempenham um papel importante no desenvolvimento de embriões de vertebrados e invertebrados (SMITH, 1999). Em salamandra, *Andrias davidianus*, o *tbx1* foi detectado nas células somáticas e germinativas antes e após a diferenciação gonadal, sendo detectado nas espermatogônias e células somáticas dos machos, e nas células da granulosa das fêmeas (HU; MENG; WANG; TIAN *et al.*, 2019). Ainda em salamandra, injeção da proteína *tbx1* em fêmeas resultou na diminuição da expressão de *foxl2* e *cyp19a* e o *knockdown* de *tbx1*/siRNA em machos ocasionou um aumento nos níveis de expressão do *foxl2*, *cyp19a* e *star* e uma diminuição do *amh*, *cyp26a*, *dmrt1* e *wt1* (HU; MENG; WANG; TIAN *et al.*, 2019; PAPAIOANNOU, 2014), sugerindo assim que o *tbx1* influencia a expressão de genes relacionados ao sexo e participa da regulação da diferenciação testicular (HU; MENG; WANG; TIAN *et al.*, 2019). Em truta, o *tbx1* é expresso nas células somáticas durante a diferenciação gonadal masculina sendo pouco ou nula a expressão durante a diferenciação gonadal feminina (YANO; NICOL; GUERIN; GUIGUEN, 2011).

Membros da família de receptor nuclear, *nr0b2* (*shp*), *nr5a2* encontram-se mais expressos no grupo MT em relação ao controle e E2. Em camundongos, o *Nr0b2*, expresso no compartimento intersticial do testículo, determina o tempo de diferenciação das células germinativas e também inibe a expressão de genes esteroideogênicos (VOLLE; DUGGAVATHI; MAGNIER; HOUTEN *et al.*, 2007). Nos teleósteos, *nr0b2* e *nr5a2* são

descrito nas gônadas de ambos os sexos durante o início do desenvolvimento (HAUGEN; ALMEIDA; ANDERSSON; BOGERD *et al.*, 2012; WANG; YOU; WENG; WEN *et al.*, 2015).

O MT também estimulou a expressão do TGF- $\alpha$ , membro da família EGF (*Epidermal Growth Factor*) e do GFR- $\alpha$  membro da família GDNF (*Glial cell-derived neurotrophic fator*) em relação ao E2. Em camundongo, o TGF- $\alpha$  estimula a diferenciação das espermatogônias do tipo A (TAJIMA; WATANABE; KOSHIMIZU; MATSUZAWA *et al.*, 1995), assim como é um fator importante na regulação do crescimento do testículo embrionário (LEVINE; CUPP; MIYASHIRO; SKINNER, 2000). Já o GFR- $\alpha$  é um fator de crescimento que em truta está associado à proliferação das espermatogônias tronco (BELLAÏCHE; GOUPIL; SAMBRONI; LAREYRE *et al.*, 2014).

Em relação ao Sox9, nossos dados mostram que ambos *sox9* e *sox9-like* foram regulados negativamente no grupo tratado com MT quando comparado ao grupo controle. Esses genes não se apresentaram diferencialmente regulados na comparação entre os grupos E2 vs controle, e MT vs E2. Em mamíferos, o Sox9 é um dos elementos principais na determinação do sexo masculino e na diferenciação dos testículos (WAGNER; WIRTH; MEYER; ZABEL *et al.*, 1994). Apesar de ser considerado um gene pró-macho, o Sox9 é detectado durante o desenvolvimento em ambos os sexos (HANLEY; HAGAN; CLEMENT-JONES; BALL *et al.*, 2000). Em *Japanese flounder*, o *sox9a* e *sox9b* estão presentes na gônada indiferenciada, e após a diferenciação há um aumento na expressão de *sox9a* nos machos. Neste mesmo estudo, a administração de MT aumentou o nível de expressão *sox9b* (LI; YU; WANG; LIU *et al.*, 2018).

Em mamíferos, o Sry e Sf-1 ou Nr5a1 são os principais reguladores da expressão do Sox9 no início do desenvolvimento gonadal, em seguida o Sox9 mantém sua expressão

ativando os genes *Fgf9*, *Frgr2* e *Ptgds* (KIM; BINGHAM; SEKIDO; PARKER *et al.*, 2007; WILHELM; MARTINSON; BRADFORD; WILSON *et al.*, 2005). Nos dados gerados aqui, *nr5a1* e *ptgds* não apresentaram diferença entre os grupos. Já o *fgf9* e *fgfr2* não foram encontrados nos dados do transcriptoma.

Ainda em relação aos genes regulados negativamente pelo MT quando comparados ao controle, os receptores *fgfr3* e *fgfr4* foram menos expressos no grupo MT. Esses genes são membros da família de receptores do fator de crescimento de fibroblastos (*fgfr*) e estão presente no desenvolvimento do testículo em mamíferos (LAI; WANG; YANG; WU *et al.*, 2016; ORNITZ; ITOH, 2015). Diferentemente do *Fgfr2* onde a perda da função em camundongos resulta em reversão sexual parcial de macho para fêmea (BAGHERI-FAM; SIM; BERNARD; JAYAKODY *et al.*, 2008), camundongos knockout para *fgfr3* e *fgfr4* tiveram o desenvolvimento testicular normal.

## 7. CONCLUSÃO

Este estudo revelou que o ligante *kiss1* foi estimulado por ambos os tratamentos, MT e E2, mostrando que o tratamento hormonal regula, direta ou indiretamente, a expressão deste gene. O tratamento com MT estimulou o desenvolvimento testicular e ativou genes pró-machos. Por outro lado, o tratamento com E2 alterou o destino da diferenciação sexual das gônadas, resultando em um ovário no início do desenvolvimento, bem como ativou genes pró-fêmeas. O conjunto de dados do transcriptoma *de novo* das gônadas gerado aqui representa um recurso genômico valioso para a triagem de vias e genes potenciais envolvidos na diferenciação sexual de *C. undecimalis*. Nossa análise identificou genes bem conhecidos e alguns ainda pouco elucidados associados à mudança de sexo, bem como genes-alvo regulatórios em potencial.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADOLFI, M. C.; HERPIN, A.; REGENSBURGER, M.; SACQUEGNO, J. *et al.* Retinoic acid and meiosis induction in adult versus embryonic gonads of medaka. **Sci Rep**, 6, p. 34281, Sep 2016.
- ALVARADO, M. V.; SERVILI, A.; MOLÉS, G.; GUEGUEN, M. M. *et al.* Actions of sex steroids on kisspeptin expression and other reproduction-related genes in the brain of the teleost fish European sea bass. **J Exp Biol**, 219, n. Pt 21, p. 3353-3365, Nov 2016.
- BAGHERI-FAM, S.; SIM, H.; BERNARD, P.; JAYAKODY, I. *et al.* Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. **Dev Biol**, 314, n. 1, p. 71-83, Feb 2008.
- BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H. The Reversible Sex of Gonochoristic Fish: Insights and Consequences. **Sex Dev**, 10, n. 5-6, p. 242-266, 2016.
- BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H.; SAILLANT, E. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. **Sex Dev**, 3, n. 2-3, p. 118-135, 2009.
- BAROILLER, J. F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cell. Mol. Life Sci**, 55, n. 6, p. 910-931, Jun 1999.
- BARON, D.; COCQUET, J.; XIA, X.; FELLOUS, M. *et al.* An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. **J Mol Endocrinol**, 33, n. 3, p. 705-715, Dec 2004.
- BARRIOS, F.; FILIPPONI, D.; PELLEGRINI, M.; PARONETTO, M. P. *et al.* Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. **J Cell Sci**, 123, n. Pt 6, p. 871-880, Mar 2010.
- BELLAÏCHE, J.; GOUPIL, A. S.; SAMBRONI, E.; LAREYRE, J. J. *et al.* Gdnf-Gfra1 pathway is expressed in a spermatogenetic-dependent manner and is regulated by Fsh in a fish testis. **Biol Reprod**, 91, n. 4, p. 94, Oct 2014.
- BIRAN, J.; BEN-DOR, S.; LEVAVI-SIVAN, B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. **Biol Reprod**, 79, n. 4, p. 776-786, Oct 2008.
- BLÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; PAPADAKI, M.; MYLONAS, C. *et al.* Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Gen Comp Endocrinol**, 158, n. 1, p. 95-101, Aug 2008.
- BONNARD, C.; STROBL, A. C.; SHBOUL, M.; LEE, H. *et al.* Mutations in IRX5 impair craniofacial development and germ cell migration via SDF1. **Nat Genet**, 44, n. 6, p. 709-713, May 2012.
- BOULANGER, L.; PANNETIER, M.; GALL, L.; ALLAIS-BONNET, A. *et al.* FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. **Curr Biol**, 24, n. 4, p. 404-408, Feb 2014.
- BOWLES, J.; KNIGHT, D.; SMITH, C.; WILHELM, D. *et al.* Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. **Science**, 312, n. 5773, p. 596, 2006.

- BOWLES, J.; KOOPMAN, P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. **Development**, 134, n. 19, p. 3401-3411, Oct 2007.
- BRAAT, A. K.; SPEKSNIJDER, J. E.; ZIVKOVIC, D. Germ line development in fishes. **Int J Dev Biol**, 43, n. 7, p. 745-760, 1999.
- CAVODEASSI, F.; MODOLELL, J.; GÓMEZ-SKARMETA, J. L. The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. **Development**, 128, n. 15, p. 2847-2855, Aug 2001.
- CHASSOT, A. A.; BRADFORD, S. T.; AUGUSTE, A.; GREGOIRE, E. P. *et al.* WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. **Development**, 139, n. 23, p. 4461-4472, Dec 2012.
- CHASSOT, A. A.; RANC, F.; GREGOIRE, E. P.; ROEPERS-GAJADIEN, H. L. *et al.* Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. **Hum Mol Genet**, 17, n. 9, p. 1264-1277, May 2008.
- CHEN, H.; LI, S.; XIAO, L.; ZHANG, Y. *et al.* Wnt4 in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): identification and expression. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 183, p. 67-74, May 2015.
- CLARK, A. M.; GARLAND, K. K.; RUSSELL, L. D. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. **Biol Reprod**, 63, n. 6, p. 1825-1838, Dec 2000.
- CUI, Z.; LIU, Y.; WANG, W.; WANG, Q. *et al.* Genome editing reveals dmrt1 as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Sci Rep**, 7, p. 42213, Feb 2017.
- DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J.-C.; MATSUDA, F. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 19, p. 10972, 2003.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, 208, n. 3, p. 191-364, Jun 2002.
- EL-GREISY, Z. A.; EL-GAMAL, A. E. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 $\alpha$ -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. **Egypt J Aquat Res**, 38, n. 1, p. 59-66, Jan 2012.
- FENG, R.; FANG, L.; CHENG, Y.; HE, X. *et al.* Retinoic acid homeostasis through aldh1a2 and cyp26a1 mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci Rep**, 5, p. 10131, May 2015.
- FU, A.; OBERHOLTZER, S. M.; BAGHERI-FAM, S.; RASTETTER, R. H. *et al.* Dynamic expression patterns of *Irx3* and *Irx5* during germline nest breakdown and primordial follicle formation promote follicle survival in mouse ovaries. **PLoS Genet**, 14, n. 8, p. e1007488, Aug 2018.
- FUNES, S.; HEDRICK, J. A.; VASSILEVA, G.; MARKOWITZ, L. *et al.* The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. **Biochem Biophys Res Commun**, 312, n. 4, p. 1357-1363, Dec 2003.

- GUIGUEN, Y.; BAROILLER, J. F.; RICORDEL, M. J.; ISEKI, K. *et al.* Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Mol Reprod Dev**, 54, n. 2, p. 154-162, Oct 1999.
- HANLEY, N. A.; HAGAN, D. M.; CLEMENT-JONES, M.; BALL, S. G. *et al.* SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. **Mech Dev**, 91, n. 1-2, p. 403-407, Mar 2000.
- HATANO, O.; TAKAKUSU, A.; NOMURA, M.; MOROHASHI, K. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. **Genes Cells**, 1, n. 7, p. 663-671, Jul 1996.
- HAUGEN, T.; ALMEIDA, F. F.; ANDERSSON, E.; BOGERD, J. *et al.* Sex differentiation in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): morphological and gene expression studies. **Reprod Biol Endocrinol**, 10, p. 47, Jun 2012.
- HERPIN, A.; SCHARTL, M. Plasticity of gene-regulatory networks controlling sex determination: of masters, slaves, usual suspects, newcomers, and usurpators. **EMBO Rep**, 16, n. 10, p. 1260-1274, Oct 2015.
- HU, Q.; MENG, Y.; WANG, D.; TIAN, H. *et al.* Characterization and function of the T-box 1 gene in Chinese giant salamander *Andrias davidianus*. **Genomics**, 111, n. 6, p. 1351-1359, Dec 2019.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; TAN, Q.; COLLINS, J. R. *et al.* The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. **Genome Biol**, 8, n. 9, p. R183, 2007.
- IRWIG, M. S.; FRALEY, G. S.; SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V. *et al.* Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. **Neuroendocrinology**, 80, n. 4, p. 264-272, 2004.
- KANDA, S.; AKAZOME, Y.; MATSUNAGA, T.; YAMAMOTO, N. *et al.* Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*oryzias latipes*). **Endocrinology**, 149, n. 5, p. 2467-2476, May 2008.
- KANDA, S.; KARIGO, T.; OKA, Y. Steroid sensitive kiss2 neurones in the goldfish: evolutionary insights into the duplicate kisspeptin gene-expressing neurones. **J Neuroendocrinol**, 24, n. 6, p. 897-906, Jun 2012.
- KAUFFMAN, A. S.; PARK, J. H.; MCPHIE-LALMANSINGH, A. A.; GOTTSCH, M. L. *et al.* The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. **J Neurosci**, 27, n. 33, p. 8826-8835, Aug 2007.
- KAWASE, E.; HASHIMOTO, K.; PEDERSEN, R. A. Autocrine and paracrine mechanisms regulating primordial germ cell proliferation. **Mol Reprod Dev**, 68, n. 1, p. 5-16, May 2004.
- KIM, Y.; BINGHAM, N.; SEKIDO, R.; PARKER, K. L. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 42, p. 16558-16563, Oct 2007.
- KIM, Y.; KOBAYASHI, A.; SEKIDO, R.; DINAPOLI, L. *et al.* Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. **PLoS Biol**, 4, n. 6, p. e187, Jun 2006.

KITANO, T.; TAKAMUNE, K.; NAGAHAMA, Y.; ABE, S. I. Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Mol Reprod Dev**, 56, n. 1, p. 1-5, May 2000.

KOBAYASHI, Y.; NAGAHAMA, Y.; NAKAMURA, M. Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. **Sex Dev**, 7, n. 1-3, p. 115-125, 2013.

KOOPMAN, P.; GUBBAY, J.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P. *et al.* Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. **Nature**, 351, n. 6322, p. 117-121, May 1991.

KOSSACK, M. E.; HIGH, S. K.; HOPTON, R. E.; YAN, Y. L. *et al.* Female Sex Development and Reproductive Duct Formation Depend on Wnt4a in Zebrafish. **Genetics**, 211, n. 1, p. 219-233, Jan 2019.

KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D. *et al.* The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **J Biol Chem**, 276, n. 37, p. 34631-34636, Sep 2001.

KOTH, M. L.; GARCIA-MORENO, S. A.; NOVAK, A.; HOLTHUSEN, K. A. *et al.* Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin activity and differential epigenetic marks direct sexually dimorphic regulation of. **Development**, 147, n. 6, Mar 2020.

LAI, M. S.; WANG, C. Y.; YANG, S. H.; WU, C. C. *et al.* The expression profiles of fibroblast growth factor 9 and its receptors in developing mice testes. **Organogenesis**, 12, n. 2, p. 61-77, 04 2016.

LAU, E. S.; ZHANG, Z.; QIN, M.; GE, W. Knockout of Zebrafish Ovarian Aromatase Gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 Leads to All-male Offspring Due to Failed Ovarian Differentiation. **Sci Rep**, 6, p. 37357, Nov 2016.

LE PAGE, Y.; DIOTEL, N.; VAILLANT, C.; PELLEGRINI, E. *et al.* Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm. **Eur J Neurosci**, 32, n. 12, p. 2105-2115, Dec 2010.

LEE, C. H.; HUR, S. W.; NA, O. S.; BAEK, H. J. *et al.* Induction of Primary Male in Juvenile Red Spotted Grouper *Epinephelus akaara* by Immersion of 17 $\alpha$ -Methyltestosterone. **Dev Reprod**, 18, n. 3, p. 127-131, Sep 2014.

LEE, J. H.; MIELE, M. E.; HICKS, D. J.; PHILLIPS, K. K. *et al.* KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. **J Natl Cancer Inst**, 88, n. 23, p. 1731-1737, Dec 1996.

LEE, Y. H.; YUEH, W. S.; DU, J. L.; SUN, L. T. *et al.* Aromatase inhibitors block natural sex change and induce male function in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker: possible mechanism of natural sex change. **Biol Reprod**, 66, n. 6, p. 1749-1754, Jun 2002.

LEET, J. K.; GALL, H. E.; SEPÚLVEDA, M. S. A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. **J Appl Toxicol**, 31, n. 5, p. 379-398, Jul 2011.

LEHMAN, M. N.; MERKLEY, C. M.; COOLEN, L. M.; GOODMAN, R. L. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. **Brain Res**, 1364, p. 90-102, Dec 2010.

- LEVINE, E.; CUPP, A. S.; MIYASHIRO, L.; SKINNER, M. K. Role of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in embryonic rat testis development. **Biol Reprod**, 62, n. 3, p. 477-490, Mar 2000.
- LI, M.; FENG, R.; MA, H.; DONG, R. *et al.* Retinoic acid triggers meiosis initiation via *stra8*-dependent pathway in Southern catfish, *Silurus meridionalis*. **Gen Comp Endocrinol**, 232, p. 191-198, Jun 2016.
- LI, Q.; ZHOU, X.; GUO, Y.; SHANG, X. *et al.* Nuclear localization, DNA binding and restricted expression in neural and germ cells of zebrafish *Dmrt3*. **Biol Cell**, 100, n. 8, p. 453-463, Aug 2008.
- LI, S.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; HUANG, X. *et al.* Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). **J Endocrinol**, 201, n. 3, p. 407-418, Jun 2009.
- LI, X.; YU, H.; WANG, Y.; LIU, X. *et al.* Roles of Two *Sox9* Genes during Gonadal Development in Japanese Flounder: Sex Differentiation, Spermatogenesis and Gonadal Function Maintenance. **Int J Mol Sci**, 19, n. 2, Feb 2018.
- LIU, C. F.; BINGHAM, N.; PARKER, K.; YAO, H. H. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. **Hum Mol Genet**, 18, n. 3, p. 405-417, Feb 2009.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, 15, n. 12, p. 550, 2014.
- LUO, W.; GU, L.; LI, J.; GONG, Y. Transcriptome sequencing revealed that knocking down *FOXL2* affected cell proliferation, the cell cycle, and DNA replication in chicken pre-ovulatory follicle cells. **PLoS One**, 15, n. 7, 2020.
- MAATOUK, D. M.; DINAPOLI, L.; ALVERS, A.; PARKER, K. L. *et al.* Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. **Hum Mol Genet**, 17, n. 19, p. 2949-2955, Oct 2008.
- MAGEE, C.; FORADORI, C. D.; BRUEMMER, J. E.; ARREGUIN-AREVALO, J. A. *et al.* Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. **Endocrinology**, 150, n. 6, p. 2813-2821, Jun 2009.
- MATSON, C. K.; MURPHY, M. W.; SARVER, A. L.; GRISWOLD, M. D. *et al.* *DMRT1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. **Nature**, 476, n. 7358, p. 101-104, Jul 2011.
- MATSUI, H.; TAKATSU, Y.; KUMANO, S.; MATSUMOTO, H. *et al.* Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. **Biochem Biophys Res Commun**, 320, n. 2, p. 383-388, Jul 2004.
- MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Male gonadal differentiation and the paedomorphic evolution of the testis in Teleostei. **Anat Rec (Hoboken)**, 297, n. 6, p. 1137-1162, Jun 2014.
- MESSAGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; MA, D.; HENDRICK, A. G. *et al.* Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 5, p. 1761-1766, Feb 2005.

- MIGAUD, H.; ISMAIL, R.; COWAN, M.; DAVIE, A. Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Gen Comp Endocrinol**, 179, n. 3, p. 384-399, Dec 2012.
- MINKINA, A.; MATSON, C. K.; LINDEMAN, R. E.; GHYSELINCK, N. B. *et al.* DMRT1 protects male gonadal cells from retinoid-dependent sexual transdifferentiation. **Dev Cell**, 29, n. 5, p. 511-520, Jun 2014.
- MITANI, Y.; KANDA, S.; AKAZOME, Y.; ZEMPO, B. *et al.* Hypothalamic Kiss1 but Not Kiss2 Neurons Are Involved in Estrogen Feedback in Medaka (*Oryzias latipes*). **Endocrinology**, 151, n. 4, p. 1751-1759, 2010.
- MORENO, S. G.; ATTALI, M.; ALLEMAND, I.; MESSIAEN, S. *et al.* TGFbeta signaling in male germ cells regulates gonocyte quiescence and fertility in mice. **Dev Biol**, 342, n. 1, p. 74-84, Jun 2010.
- NAKAMURA, S.; AOKI, Y.; SAITO, D.; KUROI, Y. *et al.* Sox9b/sox9a2-EGFP transgenic medaka reveals the morphological reorganization of the gonads and a common precursor of both the female and male supporting cells. **Mol Reprod Dev**, 75, n. 3, p. 472-476, Mar 2008.
- NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; BARREIRO, M. L. *et al.* Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. **Endocrinology**, 145, n. 10, p. 4565-4574, Oct 2004.
- OHGA, H.; ADACHI, H.; MATSUMORI, K.; KODAMA, R. *et al.* mRNA levels of kisspeptins, kisspeptin receptors, and GnRH1 in the brain of chub mackerel during puberty. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 179, p. 104-112, Jan 2015.
- OHGA, H.; FUJINAGA, Y.; SELVARAJ, S.; KITANO, H. *et al.* Identification, characterization, and expression profiles of two subtypes of kisspeptin receptors in a scombroid fish (chub mackerel). **Gen Comp Endocrinol**, 193, p. 130-140, Nov 2013.
- ORNITZ, D. M.; ITOH, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 4, n. 3, p. 215-266, 2015 May-Jun 2015.
- PAPAIIOANNOU, V. E. The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. **Development**, 141, n. 20, p. 3819-3833, Oct 2014.
- PARMA, P.; RADI, O.; VIDAL, V.; CHABOISSIER, M. C. *et al.* R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. **Nat Genet**, 38, n. 11, p. 1304-1309, Nov 2006.
- PASQUIER, J.; LAFONT, A. G.; JENG, S. R.; MORINI, M. *et al.* Multiple kisspeptin receptors in early osteichthyans provide new insights into the evolution of this receptor family. **PLoS One**, 7, n. 11, p. e48931, 2012.
- PASQUIER, J.; LAFONT, A. G.; TOSTIVINT, H.; VAUDRY, H. *et al.* Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 3, p. 173, 2012.
- PASSINI, G.; STERZELECKI, F. C.; DE CARVALHO, C. V. A.; BALOI, M. F. *et al.* 17 $\alpha$ -Methyltestosterone implants accelerate spermatogenesis in common snook, *Centropomus undecimalis*, during first sexual maturation. **Theriogenology**, 106, p. 134-140, Jan 2018.

PHUC THUONG, N.; SUNG, Y. Y.; AMBAK, M. A.; ABOL-MUNAFI, A. B. The hormone 17 $\beta$ -estradiol promotes feminization of juveniles protandrous hermaphrodite false clownfish (*Amphiprion ocellaris*). **Mar Freshw Behav Phy**, 50, n. 3, p. 195-204, May 2017.

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, 197, n. 1, p. 229-281, Jun 2001.

PITETTI, J. L.; CALVEL, P.; ROMERO, Y.; CONNE, B. *et al.* Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice. **PLoS Genet**, 9, n. 1, p. e1003160, 2013.

SARTER, K.; PAPADAKI, M.; ZANUY, S.; MYLONAS, C. C. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 $\alpha$ -methyltestosterone implants. **Aquaculture**, 256, n. 1, p. 443-456, Jun 2006.

SCHARTL, M. A comparative view on sex determination in medaka. **Mech Dev**, 121, n. 7-8, p. 639-645, Jul 2004.

SEKIDO, R.; BAR, I.; NARVÁEZ, V.; PENNY, G. *et al.* SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. **Dev Biol**, 274, n. 2, p. 271-279, Oct 2004.

SEKIDO, R.; LOVELL-BADGE, R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. **Nature**, 453, n. 7197, p. 930-934, Jun 2008.

SELVARAJ, S.; OHGA, H.; KITANO, H.; NYUJI, M. *et al.* Peripheral administration of Kiss1 pentadecapeptide induces gonadal development in sexually immature adult scombroid fish. **Zoolog Sci**, 30, n. 6, p. 446-454, Jun 2013.

SELVARAJ, S.; OHGA, H.; NYUJI, M.; KITANO, H. *et al.* Subcutaneous administration of Kiss1 pentadecapeptide accelerates spermatogenesis in prepubertal male chub mackerel (*Scomber japonicus*). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 166, n. 2, p. 228-236, Oct 2013.

SEMINARA, S. B.; MESSENGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R. *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. **N Engl J Med**, 349, n. 17, p. 1614-1627, Oct 2003.

SERVILI, A.; LE PAGE, Y.; LEPRINCE, J.; CARATY, A. *et al.* Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. **Endocrinology**, 152, n. 4, p. 1527-1540, Apr 2011.

SHI, Y.; ZHANG, Y.; LI, S.; LIU, Q. *et al.* Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17 $\alpha$ -methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. **Biol Reprod**, 83, n. 1, p. 63-74, Jul 2010.

SHIBATA, M.; FRIEDMAN, R. L.; RAMASWAMY, S.; PLANT, T. M. Evidence that down regulation of hypothalamic KiSS-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **J Neuroendocrinol**, 19, n. 6, p. 432-438, Jun 2007.

SIMPSON, E. R.; MAHENDROO, M. S.; MEANS, G. D.; KILGORE, M. W. *et al.* Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocr Rev**, 15, n. 3, p. 342-355, Jun 1994.

SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V. *et al.* BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, 31, n. 19, p. 3210-3212, Oct 2015.

SINCLAIR, A.; SMITH, C. Females battle to suppress their inner male. **Cell**, 139, n. 6, p. 1051-1053, Dec 2009.

SINGH, A. K. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. **Gen Comp Endocrinol**, 181, p. 146-155, Jan 2013.

SMITH, C. A.; ROESZLER, K. N.; OHNESORG, T.; CUMMINS, D. M. *et al.* The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. **Nature**, 461, n. 7261, p. 267-271, Sep 2009.

SMITH, E. K.; GUZMÁN, J. M.; LUCKENBACH, J. A. Molecular cloning, characterization, and sexually dimorphic expression of five major sex differentiation-related genes in a Scorpaeniform fish, sablefish (*Anoplopoma fimbria*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 165, n. 2, p. 125-137, Jun 2013.

SMITH, J. T-box genes: what they do and how they do it. **Trends Genet**, 15, n. 4, p. 154-158, Apr 1999.

SMITH, J. T.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. **Reproduction**, 131, n. 4, p. 623-630, Apr 2006.

SMITH, J. T.; CUNNINGHAM, M. J.; RISSMAN, E. F.; CLIFTON, D. K. *et al.* Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, 146, n. 9, p. 3686-3692, Sep 2005.

SMITH, J. T.; DUNGAN, H. M.; STOLL, E. A.; GOTTSCH, M. L. *et al.* Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. **Endocrinology**, 146, n. 7, p. 2976-2984, Jul 2005.

SMITH, J. T.; LI, Q.; PEREIRA, A.; CLARKE, I. J. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, 150, n. 12, p. 5530-5538, Dec 2009.

SPEED, R. M. Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. **Chromosoma**, 85, n. 3, p. 427-437, 1982.

SRIDEVI, P.; SENTHILKUMARAN, B. Cloning and differential expression of FOXL2 during ovarian development and recrudescence of the catfish, *Clarias gariepinus*. **Gen Comp Endocrinol**, 174, n. 3, p. 259-268, Dec 2011.

STAMATAKIS, A. RAXML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, 30, n. 9, p. 1312-1313, May 2014.

TAJIMA, Y.; WATANABE, D.; KOSHIMIZU, U.; MATSUZAWA, T. *et al.* Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-alpha stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes. **Int J Androl**, 18, n. 1, p. 8-12, Feb 1995.

TARANGER, G. L.; CARRILLO, M.; SCHULZ, R. W.; FONTAINE, P. *et al.* Control of puberty in farmed fish. **Gen Comp Endocrinol**, 165, n. 3, p. 483-515, Feb 2010.

- TENA-SEMPERE, M.; FELIP, A.; GÓMEZ, A.; ZANUY, S. *et al.* Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. **Gen Comp Endocrinol**, 175, n. 2, p. 234-243, Jan 2012.
- TODD, E. V.; LIU, H.; MUNCASTER, S.; GEMMELL, N. J. Bending Genders: The Biology of Natural Sex Change in Fish. **Sex Dev**, 10, n. 5-6, p. 223-241, 2016.
- TODD, E. V.; ORTEGA-RECALDE, O.; LIU, H.; LAMM, M. S. *et al.* Stress, novel sex genes, and epigenetic reprogramming orchestrate socially controlled sex change. **Sci Adv**, 5, n. 7, Jul 2019.
- TOMIZUKA, K.; HORIKOSHI, K.; KITADA, R.; SUGAWARA, Y. *et al.* R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. **Hum Mol Genet**, 17, n. 9, p. 1278-1291, May 2008.
- TOVAR BOHÓRQUEZ, M. O.; MECHALY, A. S.; HUGHES, L. C.; CAMPANELLA, D. *et al.* Kisspeptin system in pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). Characterization and gene expression pattern during early developmental stages. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 204, p. 146-156, Feb 2017.
- TSUDA, M.; SASAOKA, Y.; KISO, M.; ABE, K. *et al.* Conserved role of nanos proteins in germ cell development. **Science**, 301, n. 5637, p. 1239-1241, Aug 2003.
- UHLENHAUT, N. H.; JAKOB, S.; ANLAG, K.; EISENBERGER, T. *et al.* Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. **Cell**, 139, n. 6, p. 1130-1142, Dec 2009.
- VAINIO, S.; HEIKKILÄ, M.; KISPERT, A.; CHIN, N. *et al.* Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. **Nature**, 397, n. 6718, p. 405-409, Feb 1999.
- VARJOSALO, M.; TAIPALE, J. Hedgehog: functions and mechanisms. **Genes Dev**, 22, n. 18, p. 2454-2472, Sep 2008.
- VIDAL, V.; SCHEDL, A. Requirement of WT1 for gonad and adrenal development: insights from transgenic animals. **Endocr Res**, 26, n. 4, p. 1075-1082, Nov 2000.
- VIZZIANO-CANTONNET, D.; LASALLE, A.; DI LANDRO, S.; KLOPP, C. *et al.* De novo transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. **Gen Comp Endocrinol**, 268, p. 96-109, Nov 2018.
- VOLLE, D. H.; DUGGAVATHI, R.; MAGNIER, B. C.; HOUTEN, S. M. *et al.* The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. **Genes Dev**, 21, n. 3, p. 303-315, Feb 2007.
- WAGNER, T.; WIRTH, J.; MEYER, J.; ZABEL, B. *et al.* Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. **Cell**, 79, n. 6, p. 1111-1120, Dec 1994.
- WANG, D. S.; KOBAYASHI, T.; ZHOU, L. Y.; PAUL-PRASANTH, B. *et al.* Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. **Mol Endocrinol**, 21, n. 3, p. 712-725, Mar 2007.

- WANG, L.; YOU, F.; WENG, S.; WEN, A. *et al.* Molecular cloning and sexually dimorphic expression patterns of nr0b1 and nr5a2 in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Dev Genes Evol**, 225, n. 2, p. 95-104, Apr 2015.
- WILHELM, D.; MARTINSON, F.; BRADFORD, S.; WILSON, M. J. *et al.* Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. **Dev Biol**, 287, n. 1, p. 111-124, Nov 2005.
- WINKLER, C.; HORNUNG, U.; KONDO, M.; NEUNER, C. *et al.* Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal dmrt genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*). **Mech Dev**, 121, n. 7-8, p. 997-1005, Jul 2004.
- WU, G. C.; CHANG, C. F. wnt4 Is associated with the development of ovarian tissue in the protandrous black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. **Biol Reprod**, 81, n. 6, p. 1073-1082, Dec 2009.
- WU, G. C.; TOMY, S.; NAKAMURA, M.; CHANG, C. F. Dual roles of cyp19a1a in gonadal sex differentiation and development in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. **Biol Reprod**, 79, n. 6, p. 1111-1120, Dec 2008.
- WU, L.; YANG, P.; LUO, F.; WANG, D. *et al.* R-spondin1 signaling pathway is required for both the ovarian and testicular development in a teleosts, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gen Comp Endocrinol**, 230-231, p. 177-185, May 2016.
- YAMAGUCHI, A.; LEE, K. H.; FUJIMOTO, H.; KADOMURA, K. *et al.* Expression of the DMRT gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**, 1, n. 1, p. 59-68, Mar 2006.
- YAMAGUCHI, T.; YAMAGUCHI, S.; HIRAI, T.; KITANO, T. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Biochem Biophys Res Commun**, 359, n. 4, p. 935-940, Aug 2007.
- YANG, Y. J.; WANG, Y.; LI, Z.; ZHOU, L. *et al.* Sequential, Divergent, and Cooperative Requirements of. **Genetics**, 205, n. 4, p. 1551-1572, Apr 2017.
- YANO, A.; NICOL, B.; GUERIN, A.; GUIGUEN, Y. The duplicated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) T-box transcription factors 1, *tbx1a* and *tbx1b*, are up-regulated during testicular development. **Mol Reprod Dev**, 78, n. 3, p. 172-180, Mar 2011.
- YAO, H. H.; MATZUK, M. M.; JORGEZ, C. J.; MENKE, D. B. *et al.* Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. **Dev Dyn**, 230, n. 2, p. 210-215, Jun 2004.
- YAO, H. H.; WHORISKEY, W.; CAPEL, B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. **Genes Dev**, 16, n. 11, p. 1433-1440, Jun 2002.
- ZHANG, Y.; LI, F.; SUN, D.; LIU, J. *et al.* Molecular analysis shows differential expression of R-spondin1 in zebrafish (*Danio rerio*) gonads. **Mol Biol Rep**, 38, n. 1, p. 275-282, Jan 2011.
- ZHOU, L.; CHARKRABORTY, T.; YU, X.; WU, L. *et al.* R-spondins are involved in the ovarian differentiation in a teleost, medaka (*Oryzias latipes*). **BMC Dev Biol**, 12, p. 36, Dec 2012.

ZHOU, L.; CHARKRABORTY, T.; ZHOU, Q.; MOHAPATRA, S. *et al.* Rspo1-activated signalling molecules are sufficient to induce ovarian differentiation in XY medaka (*Oryzias latipes*). **Sci Rep**, 6, p. 19543, Jan 2016.

ZMORA, N.; STUBBLEFIELD, J. D.; WONG, T. T.; LEVAVI-SIVAN, B. *et al.* Kisspeptin Antagonists Reveal Kisspeptin 1 and Kisspeptin 2 Differential Regulation of Reproduction in the Teleost, *Morone saxatilis*. **Biol Reprod**, 93, n. 3, p. 76, Sep 2015.