

JHENNIFER GOMES CORDEIRO

Caracterização do período de diferenciação sexual e expressão de genes relacionados a esse mecanismo em piracanjuba *Brycon orbignyanus*.

Jhennifer Gomes Cordeiro

Orientador: José Augusto Senhorini

Coorientador: Paulo Sérgio Monzani

Coorientador: Diógenes Henrique de Siqueira Silva

Botucatu, SP

2021

JHENNIFER GOMES CORDEIRO

Caracterização do período de diferenciação sexual e expressão de genes relacionados a esse mecanismo em piracanjuba *Brycon orbignyana*.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito final para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: José Augusto Senhorini.

Coorientador: Paulo Sérgio Monzani.

Coorientador: Diógenes Henrique de Siqueira Silva.

Botucatu, SP
2021

C794c Cordeiro, Jhennifer Gomes
Caracterização do período de diferenciação sexual e
expressão de genes relacionados a esse mecanismo em
piracanjuba *Brycon orbignyanus* / Jhennifer Gomes
Cordeiro. -- Botucatu, 2021
54 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: José Augusto Senhorini
Coorientador: Paulo Sérgio Monzani

1. Expressão gênica. 2. Genética animal. 3. Pré-seleção
do sexo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICO

A Deus, por me permitir e proporcionar mais essa vitória.

Aos meus pais, por me apoiarem nessa jornada

A minha avó Maria de Lourdes (*In memoriam*),
que sempre acreditou em mim e nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo o cuidado durante essa fase, e pela bondade infinita que nunca permitiu que nada me faltasse.

Aos meus pais, por todos os conselhos, pelo apoio, ajuda financeira quando necessário. Eu amo vocês, e todas as minhas conquistas são dedicadas a vocês.

A todos os meus familiares, em especial minhas irmãs e meu cunhado, eu amo vocês, obrigada pelo apoio e por acreditarem em mim.

Aos meus orientadores. Dr. José Augusto Senhorini, por todo apoio e empenho durante esse período. Dr. Paulo Sérgio Monzani, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação para que esse projeto acontecesse. E ao Dr. Diógenes Henrique de Siqueira Silva pelo apoio e dedicação durante o desenvolvimento do trabalho e pela amizade, obrigada por sempre querer o melhor para mim.

Ao professor George Shigueki Yasui, por me receber em seu laboratório e proporcionar que esse projeto ocorresse da melhor forma.

A CTG (China Three Gorges Brasil Energia Ltda) pela bolsa de mestrado.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA/ICMBio) pelo local de trabalho, disponibilidade dos peixes e todo suporte.

A todos meus colegas de laboratório, Rafaela, Andreoli, Gabriel, Bruna, Gabriela, Geovanna, Lúcia, Amanda, Rafael e Nivaldo.

A Geovanna e a Gabriela, minhas amigas e irmãs que me ajudaram em todo esse processo desde o começo, sem vocês seria muito difícil, obrigada por tanto. Geo, você me ensinou muita coisa durante esses anos, obrigada por sempre me ajudar, estar do meu lado e dividir tantos momentos comigo.

Aos meus amigos da graduação, que felizmente vão muito além disso, Juan, Felipe, Marcy, Thalyta, Camila e Elis. Vocês acreditaram desde o começo que eu conseguiria, obrigada por serem presentes, mesmo estando cada um em um canto. Amo vocês.

As minhas amigas Jeane e Raquel, mesmo estando separadas fisicamente, vocês sempre estiveram presentes nos piores e melhores momentos, obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelo amor que sempre me deram, eu amo muito vocês.

RESUMO

A piracanjuba é uma espécie em perigo de extinção classificada como (EN) A2c no Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção e, portanto, tem sido alvo de estudos e de programas de repovoamento. No entanto, tem sido observado que a criação desta espécie em ambiente artificial altera a proporção sexual dos descendentes, sendo a maioria machos. Esta alteração é indesejada para o uso destes animais como reforço de estoque em ambiente natural, podendo afetar a reprodução dos mesmos no ambiente natural. Visando compreender o motivo de tais alterações na proporção sexual, este trabalho teve como objetivos estudar os aspectos básicos de diferenciação sexual desta espécie, tal como caracterizar o período de diferenciação sexual, avaliar a expressão de genes relacionados a diferenciação, bem como verificar uma possível influência do canibalismo no período larval como um fator para alteração da proporção sexual. A análise da expressão gênica foi realizada em oócitos, larvas de 8 dias pós-fertilização, juvenis e adultos para os genes *sox9*, *dmrt1*, *foxl2*, *cyp19a*, *ddx20* e *ddx4*. Foi feita a extração de RNA e síntese de cDNA de todas as amostras, seguida da PCR convencional e os produtos de amplificação analisados em gel de eletroforese. Gônadas de juvenis de 6 a 12 meses foram processadas para histologia para caracterização do período de diferenciação sexual e a relação com a expressão dos genes. Lavas do terceiro dia pós-fertilização foram submetidas a dois tratamentos de criação até o sétimo dia, sendo realizado com larvas individualizadas e em grupo. Após 12 meses, foram coletadas as gônadas e analisadas por meio de histologia e PCR para analisar a proporção sexual entre os diferentes tratamentos. Os resultados da expressão gênica indicaram que *ddx4* e *dmrt1* são específicos das gônadas, os demais, também foram expressos em outros tecidos. Os genes *dmrt1*, *foxl2* e *sox9* apresentaram expressão dimórfica em gônada de macho e fêmea por meio da análise de eletroforese, sendo eleitos bons genes para análise quantitativa. Em larvas não foi detectada apenas a expressão de *dmrt1*, sendo os demais genes expressos, porém de difícil relação com diferenciação sexual. Em juvenis, a identificação de ovário foi realizada a partir do sexto mês e de testículos ao décimo mês por meio da histologia. Na análise histológica deste período de desenvolvimento gonadal foi observada a presença de indivíduos intersexo. Na análise de proporção sexual nos tratamentos de criação em grupo e individualizados não houve desvio de proporção, sendo a mesma de 1:1. Os resultados obtidos forneceram conhecimentos importantes para estudos futuros visando a compreensão do processo de diferenciação sexual nesta espécie.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Alinhamento da região do gene <i>ddx4</i> de <i>Astyanax mexicanus</i> e <i>Brycon orbignyanus</i>	16
Figura 2. Alinhamento da região do gene <i>ddx20</i> de <i>Colossoma macropomum</i> e <i>Brycon orbignyanus</i>	16
Figura 3. Alinhamento da região do gene <i>dmrt1</i> de <i>Astyanax mexicanus</i> e <i>Brycon orbignyanus</i>	17
Figura 4. Alinhamento da região do gene <i>sox9</i> de <i>Colossoma macropomum</i> e <i>Brycon orbignyanus</i>	17
Figura 5. Expressão dos genes em musculo (M), rim (R), fígado (F), cérebro (C) e gônada (G) em adultos machos e fêmeas de <i>Brycon orbignyanus</i>	18

Capítulo 2

Figura 1. Esquema ilustrativo do sistema de cultivo para os tratamentos 1 e 2.....	22
Figura 2. Expressão dos genes em larvas de <i>Brycon orbignyanus</i> com 7 dias pós eclosão.....	26
Figura 3. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 6 meses de idade.....	27
Figura 4. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 7 meses de idade.....	28
Figura 5. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 8 meses de idade.	29
Figura 6. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 9 meses de idade.	30
Figura 7. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 10 meses de idade.....	31
Figura 8. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 11 meses de idade.....	32
Figura 9. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 12 meses de idade.....	34
Figura 10. Indivíduos com células de linhagem espermatogônial e oócitaria.	35

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados.	14
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados.	24
Tabela 2. Genes expressos em juvenis durante o período de 7 a 12 meses de idade.	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	12
2.1. Geral:	12
2.2. Específicos:.....	12
CAPÍTULO I	13
Avaliação da expressão tecido específica de genes relacionados ao mecanismo de diferenciação sexual e desenvolvimento gonadal em adultos de piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i>	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Avaliação da expressão de genes relacionados a diferenciação sexual em tecidos de adultos	13
3.1.1. Desenho dos primers	13
3.1.2. Extração de RNA e síntese de cDNA	14
3.1.3. Avaliação de primers e confirmação das sequências	14
3.1.4. Análise da expressão dos genes de interesse	15
4. Resultados.....	15
4.1. Confirmação das sequências dos genes de piracanjuba	15
4.2. Análise da expressão dos genes de interesse nos tecidos de adultos de piracanjuba	17
5. Discussão	18
CAPÍTULO 2	21
Influência do canibalismo na proporção sexual e caracterização da diferenciação sexual da piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i>	21
1. MATERIAL E MÉTODOS	21
1.1. Reprodução da piracanjuba.....	21
1.2. Desenho experimental e coleta de amostras	22
1.2.1. Larvas	22
1.2.2. Juvenis: Tratamentos 1 e 2.....	23
1.2.3. Juvenis: Acompanhamento da diferenciação sexual	23
1.3. Avaliação da expressão de genes relacionados a diferenciação sexual em ovo, larvas e juvenis	23
1.3.1. Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica	24
1.4. Histologia.....	25
1.5. Estatística.....	25
2. Resultados.....	25
2.1. Larvas	25
2.1.1. Tratamentos de indivíduos criados em grupo e individualizados	26
2.2. Diferenciação sexual em juvenis	26
2.2.1. Histologia.....	26
2.2.2. Expressão gênica.....	35
3. DISCUSSÃO	38
4. CONCLUSÃO	42
5. REFERÊNCIAS	43
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	54

1. INTRODUÇÃO

Os estoques naturais de muitas espécies de peixes nos rios brasileiros vêm sofrendo um contínuo processo de redução, conduzindo várias espécies ao estado de ameaçadas de extinção ou até mesmo ao desaparecimento. Uma das principais causas é a interferência antrópica nos recursos hídricos, tais como a poluição, pesca predatória, desmatamento e alterações no curso dos rios. Essas interferências causam grandes impactos nas populações de peixes, afetando assim a biodiversidade aquática (ICMBIO, 2018; LOPERA-BARRERO, 2009).

Algumas alternativas foram criadas e vêm sendo empregadas na tentativa de reduzir o impacto sobre as populações de peixes em ambientes naturais. Um exemplo disso, é o controle da pesca, regulando a malhagem e comprimento das redes, evitando, desse modo, que juvenis sejam capturados e não tenham a oportunidade de reprodução, além da proteção dos locais onde as espécies realizam as desovas e o período de defeso, em que a pesca de espécies migratórias é proibida na época de reprodução, evento conhecido como piracema. No entanto, para que essas estratégias sejam idealizadas e aplicadas eficazmente, os conhecimentos prévios dos aspectos básicos da biologia e fisiologia dessas populações são de extrema importância (AGOSTINHO et al., 2005).

Estudos sobre o desenvolvimento embrionário (SANTOS et al., 2021; ARASHIRO, et al., 2018), biologia reprodutiva (CORDEIRO et al., 2019), nutrição (MELO et al., 2020; BORBA et al., 2006), incubação dos embriões e larvicultura (VILELA & HAYASHI, 2001) nos fornecem informações importantes para a conservação das espécies. Tais estudos, desde o momento da fertilização dos oócitos até o momento em que a espécie está apta à reprodução, podem auxiliar o desenvolvimento de técnicas a serem aplicadas em ações conservacionistas. Várias biotécnicas vêm sendo desenvolvidas e utilizadas como medidas de conservação, tais como a criação de bancos genéticos (INOUE *et al.*, 2012; HOLT & PICKARD, 1999), o quimerismo ou propagação mediada (YASUI et al., 2011) e a criopreservação de embriões (HIGAKI et al., 2009; BABIAK *et al.*, 2008) (ainda não estabelecida) e gametas (XIN et al., 2019; MARIA et al., 2006), as quais podem ser utilizadas em programas de repovoamento dos rios.

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma das principais espécies do gênero *Brycon*, com grande importância na aquicultura, pois é apreciada comercialmente, além de

ser produzida para a pesca esportiva (TONELLA et al., 2019; MARIA et al., 2006; BORBA et al., 2006). Esta espécie é nativa da bacia formada pelos rios Uruguai e Paraná e atualmente a sua distribuição encontra-se cada vez mais limitada (FEIDEN & HAYASHI, 2005). A espécie vem sofrendo reduções de suas populações naturais, e por este motivo é atualmente listada como “em Perigo” de extinção no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção (AKAMA et al., 2018), sendo classificada na categoria como (EN) A2c, isso porque a espécie sofreu um declínio de extensão de 92% da área de ocupação original (ICMBIO, 2014).

Esta espécie tem sido utilizada para o desenvolvimento de biotecnologias que visam a sua produção em larga escala e, principalmente, sua conservação no ambiente natural. Sendo assim alvo de estudos que têm como foco a manutenção e recuperação das populações ainda existentes. No entanto, durante etapas da produção em larga escala da piracanjuba, ainda são encontrados entraves, tal como o comportamento canibal nos primeiros dias de vida, que faz com que haja alta mortalidade entre as larvas (FEIDEN & HAYASHI, 2005). Além disso, existem dificuldades na reprodução, incubação e larvicultura em condições laboratoriais, que acabam gerando uma alta taxa de indivíduos machos, fato que limita bastante os esforços para a conservação da espécie (ZARDO et al., 2021).

Existem diversos fatores que podem levar ao desvio da proporção sexual em uma população, a exemplo a hipóxia, que em *Danio rerio* faz com que a população tenha tendência a masculinização, uma vez que a falta de oxigenação pode alterar os níveis hormonais (SHANG et al., 2006). A presença de contaminantes na água também podem influenciar na proporção sexual, como é o caso de *Oryzias melastigma*, cujo indivíduos tendem a dominância do sexo masculino na população, quando expostos ao surfactante perfluorobutanossulfonato (CHEN et al., 2019). A densidade é outro fator que pode influenciar na proporção sexual, como foi observado em *Anguilla anguilla*, que em maior densidade populacional aumenta a proporção de machos (DAVEY & JELLYMAN, 2005; RONCARATI et al., 1997). Em alguns casos, a alta densidade pode aumentar a heterogeneidade de tamanho dos indivíduos, sendo que segundo Francis e Barlow (1993) em algumas espécies indivíduos maiores se diferenciam em machos e os menores em fêmeas, essa heterogeneidade tende a gerar uma maior taxa de comportamento canibal, que por fim pode desencadear uma alteração na proporção dos sexos (ANDRADE et al., 2004; LUZ et al., 2000).

Os exemplos acima mencionados apresentam alterações causadas por fatores ambientais e sociais, que têm grande influência na determinação e diferenciação sexual. A

determinação sexual ocorre no momento da fertilização com a combinação de fatores genéticos de herança materna e paterna (BAROILLER & COTTA, 2001). A literatura aborda dois mecanismos de determinação sexual, a determinação genotípica (GSD), que se dá por meio de cromossomos sexuais (OLIVEIRA & TOLEDO, 2006), e a determinação ambiental (ESD), que é influenciada por fatores físico-químicos e sociais (DAVEY & JELLYMAN, 2005). Esses dois fatores podem agir individualmente ou em conjunto em uma mesma espécie, como é o caso do pejerrey *Odontesthes bonariensis* que possui determinação sexual XX/XY, mas que em contato com temperaturas elevadas ou baixas podem sofrer alteração fenotípica do sexo (STRUSSMANN, et al., 1996). No entanto, não se sabe se os efeitos de ESD estão agindo sobre os fatores de determinação ou de diferenciação sexual (BAROILLER & COTTA, 2001).

Essa diversidade de formas de determinação e principalmente de mecanismos de diferenciação sexual ainda que pouco elucidados, demonstram a alta plasticidade genotípica em peixes (KOBAYASHI et al., 2012), o que permite a modificação sexual nessas espécies, com auxílio da temperatura, hormônios ou até mesmo através da inibição de genes, de forma natural ou induzida (RAGHUVeer & SENTHILKUMARAN, 2009; UCHIDA et al., 2004).

Os genes são parte importante desse processo de determinação e diferenciação sexual, pois é a sua presença ou ausência que vai definir a linhagem das células germinativas. Esses mecanismos ainda são pouco elucidados, no entanto, muitos genes têm sido estudados e alguns já foram elencados como essenciais nesse processo (SHAN et al., 2021; MANOLAKOU et al., 2006).

Em machos os genes *dmrt1* e *sox9* têm sido apontados como de grande importância na diferenciação testicular de várias espécies. *dmrt1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1) é um gene ligado ao domínio DM que em algumas espécies, a exemplo de medaka (*Oryzias latipes*), está ligado ao cromossomo sexual Y (KOBAYASHI et al., 2004). Este é um dos genes mais conservados ao longo do processo evolutivo com função em várias espécies de vertebrados (LIARTE et al., 2007). Em camundongo, a perda de *dmrt1* em células de Sertoli levou a ativação de outro gene (*foxl2*), levando a reprogramação das células de Sertoli em células da granulosa (MATSON et al., 2011). Em frango *dmrt1* foi considerado como um gene necessário para a determinação testicular (SMITH et al., 2009), e em peixes como *Astyanax altiparanae* (ADOLFI et al., 2015), *Acipenser baerii* (BERBEJILLO et al., 2013), *Danio rerio* (GUO et al., 2005) esse gene atua como determinante testicular, podendo ser responsável também pela manutenção dos testículos em adultos.

sox9 (SRY-Box Transcription Factor 9) é um fator de transcrição ligado ao domínio HMG. Em humanos é expresso em condrócitos e é considerado um regulador de colágeno tipo II (HEALY et al., 1999; BI et al., 1999). A ausência desse gene pode levar a mutações em humanos causando displasia capomélica e também levando a reversão sexual XY e sua duplicação pode levar a reversão sexual em XX (HUANG et al., 1999; WAGNER et al., 1994). Em camundongo e em frango o gene também está ligado a diferenciação dos testículos (KENT et al., 1996). Em peixes a função de *sox9* é semelhante, demonstrando importância principalmente na diferenciação de testículos, a exemplo de *A. atiparanae* (ADOLFI et al., 2015), *Oncorhynchus mykiss* (TAKAMATSU et al., 1997) e *Cynoglossus semilaevis* (DONG et al., 2011) em que *sox9* é apresentado com expressão dimórfica, específica para testículo. No entanto, em medaka (*Oryzias latipes*), esse gene é predominante nos ovários, podendo ser observado também em outros tecidos, como cartilagem craniana, demonstrando que a função de *sox9* na formação da cartilagem é mantida em peixes (YOKOI et al., 2002).

Na cascata de diferenciação em fêmeas, os genes *foxl2* e *cyp19a1a* são considerados importantes para a formação e desenvolvimento do ovário em muitas espécies. *cyp19* (aromatase cytochrome P450) é responsável pela produção da aromatase, que por sua vez, converte andrógenos em estrogênio. Esse gene possui algumas variantes, sendo que *cyp19a1* (cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1) é específico de humanos, expresso em ovário e em cérebro (SIMPSON et al., 1993). Em peixes são encontradas duas variantes desse gene, *cyp19a1a* (cytochrome P450 family 19 subfamily A, polypeptide 1a) que é específico para gônadas e *cyp19a1b* cuja expressão é encontrada em cérebro (LIU et al., 2007; CHESHENKO et al., 2007; CHIANG et al., 2001). *cyp19a1a* é relacionado principalmente ao ovário adulto, embora, seja expresso em ambos os sexos durante a fase inicial do desenvolvimento, antes da diferenciação histológica, como ocorre em *Odontesthes bonariensis* (SARIDA et al., 2019; ZHANG et al., 2018), *Acanthopagrus schlegeli* (WU et al., 2008) e *Danio rerio* (HINFRAY et al., 2018; RODRÍGUEZ-MARÍ et al., 2005).

foxl2 (forkhead box L2) é um gene importantíssimo em humanos, já que sua mutação causa insuficiência ovariana prematura (POF) e também anormalidades nas pálpebras causadas pela síndrome da blefarofimose (BPES) que está associada a insuficiência ovariana (SCHMIDT et al., 2004; CRISPONI et al., 2001). Além disso *foxl2* é considerado responsável pela ativação da aromatase em cabras (PANNETIER et al., 2006), aves (GOVOROUN et al., 2004) e em algumas espécies de peixes, como é o caso da tilápia (*Oreochromis niloticus*), sendo *foxl2* responsável pela ativação de *cyp19a1* (WANG et al., 2007). Além dessa função na tilápia, esse gene é considerado de grande importância para o desenvolvimento de oócitos e, quando

superexpresso em indivíduos XY, por mais que não leve a reversão de sexo, pode gerar degeneração tecidual e proliferação de células somáticas na gônada (WANG et al., 2007; WANG et al., 2004). Outras espécies de peixes têm *foxl2* como um regulador ovariano a exemplo de *Oncorhynchus mykiss* (BARON et al., 2004) e *Cynoglossus semilaevis* (DONG et al., 2011).

Outros genes como *ddx4* e *ddx20*, são alvo também de muitos estudos, por serem genes importantes para a formação gonadal de ambos os sexos estando presentes desde o início da formação dos indivíduos (SHAN et al., 2021; TIAN et al., 2017; KROVEL & OLSEN, 2004). *ddx20* (DEAD-Box Helicase 20) é considerado um importante gene para o desenvolvimento embrionário em mamíferos, assim como também tem demonstrado importância na composição dos ovários (MOUILLET et al., 2008), e sua coo-expressão com *foxl2* provoca infraregulação da expressão de vitelogenina. Além disso, eles também são responsáveis pela apoptose de células ovarianas em crustáceos e mamíferos (LI et al., 2015; LEE et al., 2005).

ddx4 (DEAD-Box Helicase 4) também conhecido como *vasa* é um gene de extrema importância, que está ligado principalmente às células germinativas primordiais (CGPs), sendo altamente conservado entre as espécies (Revisado em RAZ, 2000). Em humanos é um regulador positivo de células cancerosas do sangue sendo assim alvo de muitos estudos que envolvem seu uso na quimioterapia (SCHUDROWITZ et al., 2017). Estudos demonstram que a sua expressão é essencial na formação e na migração das PGCs (LI et al., 2009). Em ovário humano é expresso nos folículos (CLARKSON et al., 2019) e em peixes estão presentes desde a fertilização até a fase adulta, como ocorre em *Danio rerio* (KNAUT et al., 2000; BRAAT et al., 1999; YOON et al., 1997) e em *Oryzias latipes* (LI et al., 2009).

O conhecimento dos mecanismos de diferenciação sexual fornece informações importante sobre o funcionamento e desenvolvimento de uma espécie, auxiliando no desenvolvimento de medidas que podem auxiliar a vencer os problemas observados no desvio de proporção sexual dos descendentes de piracanjuba criadas em cativeiro, assim como causas e possíveis soluções, possibilitando uma melhoria nas ações a serem aplicadas na conservação desta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

- Caracterizar o período de diferenciação sexual e a expressão de genes que possam estar relacionados a este mecanismo em piracanjuba *Brycon orbignyanus*.

2.2. Específicos:

- Avaliar a expressão tecido específica de genes relacionadas ao mecanismo de diferenciação sexual em machos e fêmeas e identificar genes diferencialmente expressos em ambos os sexos;
- Avaliar o canibalismo como possível fator de desvio da proporção sexual;
- Avaliar a expressão de genes relacionados ao mecanismo de diferenciação sexual em oócito, larva (8 dpf) e gônadas em desenvolvimento de juvenis e identificar possíveis genes a serem utilizados para definição precoce do sexo;
- Estabelecer o tempo para a diferenciação gonadal em *Brycon orbignyanus*;
- Identificar possíveis genes envolvidos na diferenciação sexual da espécie.

CAPÍTULO I

Avaliação da expressão tecido específica de genes relacionados ao mecanismo de diferenciação sexual e desenvolvimento gonadal em adultos de piracanjuba *Brycon orbignyanus*

Este capítulo aborda os experimentos realizados para a avaliação da expressão de genes, identificados na literatura, envolvidos na diferenciação sexual de machos e fêmeas. Foi avaliada a expressão tecido específica dos genes *dmrt1*, *foxl2*, *sox9*, *ddx4*, *cyp19a* e *ddx20*, utilizando vários tecidos diferentes e gônadas de macho e fêmea de adultos de *Brycon orbignyanus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Avaliação da expressão de genes relacionados a diferenciação sexual em tecidos de adultos

Amostras provenientes dos tecidos de cérebro, hipófise, músculo, rim, fígado e gônada foram coletadas de duas fêmeas e quatro machos, para identificar genes que são expressos diferencialmente em gônadas, bem como a especificidade da expressão nos tecidos.

Os genes *ddx4*, *ddx20*, *dmrt1*, *sox9*, *cyp19a* e *foxl2* são genes envolvidos na manutenção e modulação da gametogênese e foram avaliados quanto a expressão em adultos de piracanjuba. O gene *β -actina* foi utilizado como controle endógeno em todas as análises.

3.1.1. Desenho dos primers

Uma vez que não existem sequências depositadas em banco de dados para os genes de piracanjuba, os primers para *cyp19a*, *dmrt1*, *foxl2*, *sox9*, *ddx4*, *ddx20* e *β -actina* foram desenhados a partir do alinhamento das sequências de cDNA oriundas de diferentes espécies de peixes depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Inicialmente, foi realizada a busca dos genes de interesse depositados para a espécie *Astyanax mexicanus*, que é um representante da ordem Characiformes. As sequências obtidas foram utilizadas como entrada para o programa Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e encontradas as sequências de maior identidade, sendo selecionadas prioritariamente aquelas da ordem Characiformes e depois de outras ordens tais como dos Siluriformes e Cypriniformes. Após a seleção, as sequências foram analisadas utilizando o programa Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) para seleção apenas da região codante. Estas

regiões codantes foram então alinhadas utilizando o programa MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). As regiões conservadas foram selecionadas para desenho de primers específicos para estes genes (Tab.1), utilizando o programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), sendo as sequências de mRNA de *Astyanax mexicanus* utilizadas como referência.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados.

Gene	Tamanho dos amplicons em pb	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>ddx4</i>	118	AAGACCACAGGAACTGAGCG	CCCGGTCTCCATGAATGCTT
<i>ddx20</i>	715	AGTGCCATGTGTTTCATTGGT	CGACCAATCCTGTGCATGTA
<i>sox9</i>	621	AGGTGCTGAAGGGCTACGAC	ATGTTGGAGATGACGTCGCTG
<i>foxl2</i>	198	AGACCGAGAGCTTCACCAAAG	TCTCGTAGAAGGGGAACTTGTTG
<i>dmrt1</i>	167	GCAGTTTGTGGATGTCTCGG	TCAGTTTGCACCTTCTGGCAC
<i>β-actina</i>	86	CGTGCTGTCTTCCCATCCA	TCACCAACGTAGCTGTCCTTCTG
<i>cyp19a</i>	176	GGCACGGCCAGCAACTACTA	TCGTGCATGCCGAGGCACTG

3.1.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a análise da expressão gênica, as amostras foram coletadas e armazenadas a -80°C. O RNA total foi extraído com o uso de Trizol (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante e quantificado através do espectrofotômetro QIAxpert (Qiagen).

Foi utilizado 1 µg de RNA de cada amostra para a síntese da primeira fita de DNA codante (cDNA), este foi tratado com DNase I (Sigma -Aldrich) e foi utilizando o kit comercial de transcrição reversa High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific), seguindo as orientações do fabricante.

Os cDNAs gerados foram utilizados para a avaliação semi-quantitativa da expressão dos genes envolvidos na diferenciação do sexo, citados acima, em relação ao gene endógeno *β -actina*.

Os genes de interesse foram amplificados, usando como molde o cDNA das amostras de piracanjuba. Para as amplificações foram utilizados os *primers* desenhados, com as sequências listadas na Tabela 1.

3.1.3. Avaliação de primers e confirmação das sequências

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 2% e fotodocumetados para posteriores análises de expressão gênica. Para a confirmação das sequências gênicas, os produtos das amplificações foram recuperados do gel com uso do kit

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), quantificados a 260 nm no espectrofotômetro QIAxpert (QIAGEN) e clonados no vetor de clonagem pGEM –T easy (Promega). Para a ligação foi utilizada a razão de 6:1 (inserto:vetor) e o uso da enzima T4 DNA ligase, sendo esta etapa realizada a temperatura ambiente por cerca de três horas.

Células de *Escherichia coli* DH-5 α competentes foram preparadas pelo método de CaCl₂ e usadas para transformação com os produtos de ligação, através de choque térmico a 42°C durante 90 segundos. Após o choque térmico, as células foram incubadas a 37°C durante uma hora, com a adição de 800 μ L do meio de cultura LB (Lúria-Bertani), sem antibiótico. Posteriormente, as células foram plaqueadas em LB sólido contendo 50 μ g. mL⁻¹ de ampicilina, 0,5 mM de IPTG e 125 μ g. mL⁻¹ do substrato cromogênico X-gal e incubadas a 37°C durante toda a noite. A seleção das colônias positivas foi realizada através da coloração branca.

Os clones positivos foram crescidos durante toda noite a 37°C em 250 rpm e realizadas mini preparações dos vetores com o uso do kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Os clones positivos foram confirmados através de PCR utilizando os primers SP6 e T7. Os vetores foram enviados para sequenciamento e confirmação das sequencias foram avaliadas utilizando o programa Nucleotide BLAST e Multalin.

3.1.4. Análise da expressão dos genes de interesse

Os cDNAs provenientes das amostras coletadas foram utilizados para a avaliação semi-quantitativa dos genes de interesse. A PCR foi realizada em volume final de 30 μ l, usando 2 unidades de *taq* DNA polimerase recombinante (Thermo Fisher Scientific). Foram utilizados os seguintes parâmetros de ciclagem: 94°C por 5 min, seguidas de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s, seguidos de 10 min a 72°C. A reação foi realizada utilizando o termociclador MULTIGENE (Labnet International, Inc.). O produto da amplificação foi analisado em gel de agarose (Start BioScience) a 2%, por eletroforese, sendo utilizado 25 μ l de reação de PCR para a corrida de eletroforese.

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação das sequências dos genes de piracanjuba

Até o momento foram realizadas as confirmações das regiões amplificadas de piracanjuba para os cDNA de *ddx4*, *ddx20*, *dmtr1* e *sox9*, os outros produtos de amplificação para os genes *cyp19a* e *foxl2* foram enviados para sequenciamento, no entanto, não chegaram os resultados ainda.

No sequenciamento da região amplificada pelos primers desenhados para *ddx4* de *B. orbignyana*, foi verificado um total de 118 pares de bases que apresentou 92,37% de identidade (Blastn) com a mesma região depositada do RNA mensageiro do gene *ddx4* de *Astyanax mexicanus* (NCBI Reference Sequence: XM_022681259.1). Na figura 1 é apresentado o alinhamento das regiões do gene *ddx4* de *A. mexicanus* e *B. orbignyana*.

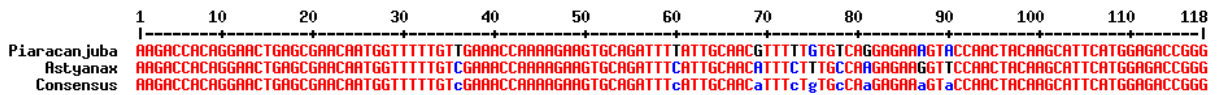


Figura 1. Alinhamento da região do gene *ddx4* de *Astyanax mexicanus* e *Brycon orbignyana*.

Para o gene *ddx20*, o sequenciamento obtido foi de 551 pares de bases com 92,27% de identidade (Blastn) com a mesma região do RNA de *ddx20* de *Collossoma macropomum* (NCBI Reference Sequence: XM_036578722.1). Neste sequenciamento a análise só foi realizada com SP6 pois o sequenciamento de T7 não foi bem-sucedido, por conta disso o tamanho da sequência apresentou diferença. A figura 2 mostra o alinhamento entre as sequências de *B. orbignyana* e *C. macropomum*.

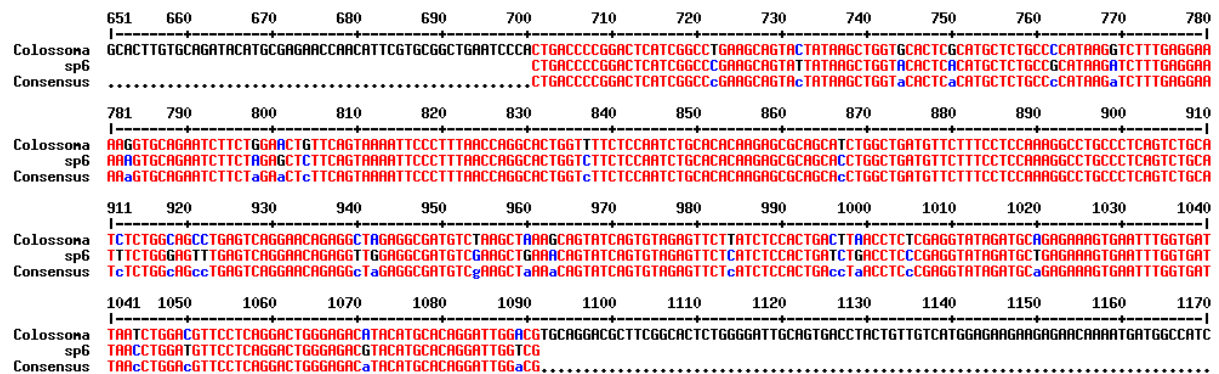


Figura 2. Alinhamento da região do gene *ddx20* de *Collossoma macropomum* e *Brycon orbignyana* (sp6).

Para o gene *dmtr1*, a região sequenciada foi de 167 pares de bases com 93,41% de identidade (Blastn) com a mesma região dos transcritos variantes 1 e 2 de *dmtr1* de *A. mexicanus* (NCBI Reference Sequence: XM_022664878.1 e XM_015607990.2, respectivamente). A figura 3, mostra o alinhamento com o transcrito variante 1 de *A. mexicanus* e a região amplificada de *Brycon orbignyana*.

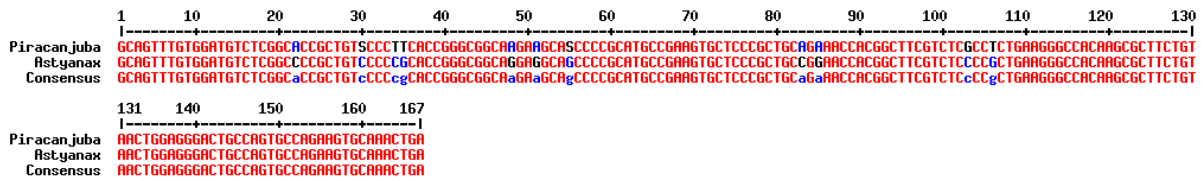


Figura 3. Alinhamento da região do gene *dmrt1* de *Astyanax mexicanus* e *Brycon orbignyanus*.

Para o gene *sox9*, o sequenciamento obtido foi de 621 pares de bases com 91,14% de identidade (Blastn) com a mesma região do RNA de *sox9* de *Colossoma macropomum* (NCBI Reference Sequence: XM_036589748.1). A figura 4 mostra o alinhamento entre as sequências de *B. orbignyanus* e *C. macropomum*.

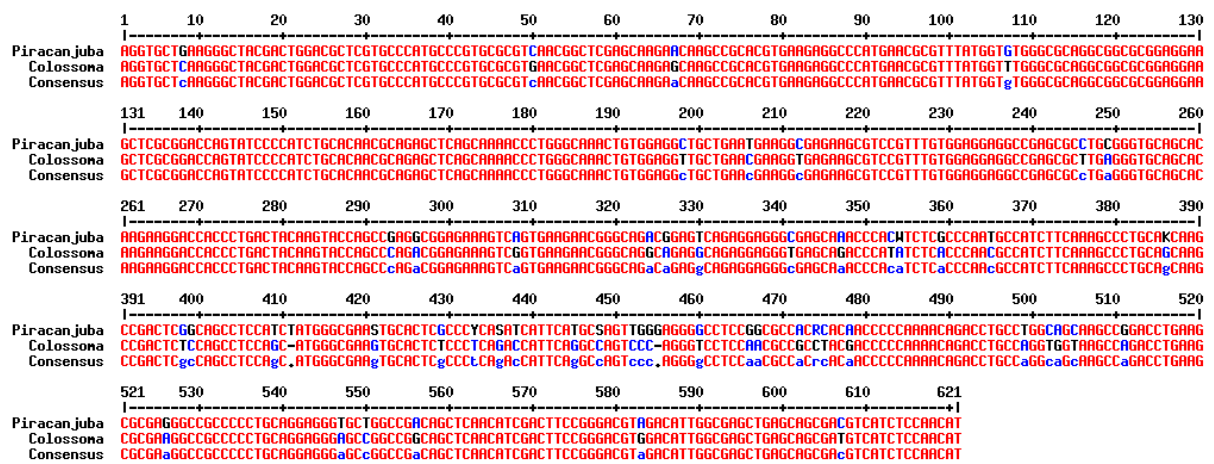


Figura 4. Alinhamento da região do gene *sox9* de *Colossoma macropomum* e *Brycon orbignyanus*.

4.2. Análise da expressão dos genes de interesse nos tecidos de adultos de piracanjuba

De todos os genes analisados, *ddx4* e *dmrt1* mostraram ser expressos especificamente nas gônadas, sendo o *dmrt1* expresso apenas em macho. Os demais genes são expressos em outros tecidos de machos e fêmeas além das gônadas. Os genes *β-actina*, *cyp19a* e *foxl2* foram expressos em todos os tecidos, sendo que para *cyp19a* as expressões em cérebro e gônada foram mais intensas que nos demais tecidos, e para *foxl2* foi observada maior expressão na gônada feminina que na masculina. Para o gene *ddx20* foi verificada baixa expressão em músculo e rim em relação aos demais tecidos. Para *sox9* não foi verificada a expressão em rim de macho e fêmea, além disso a expressão na gônada de macho é visualmente superior à vista em fêmeas (Figura 5- Em alguns indivíduos a amplificação foi muito baixa, desta forma não sendo visualizada na imagem, apenas quando observada diretamente no gel).

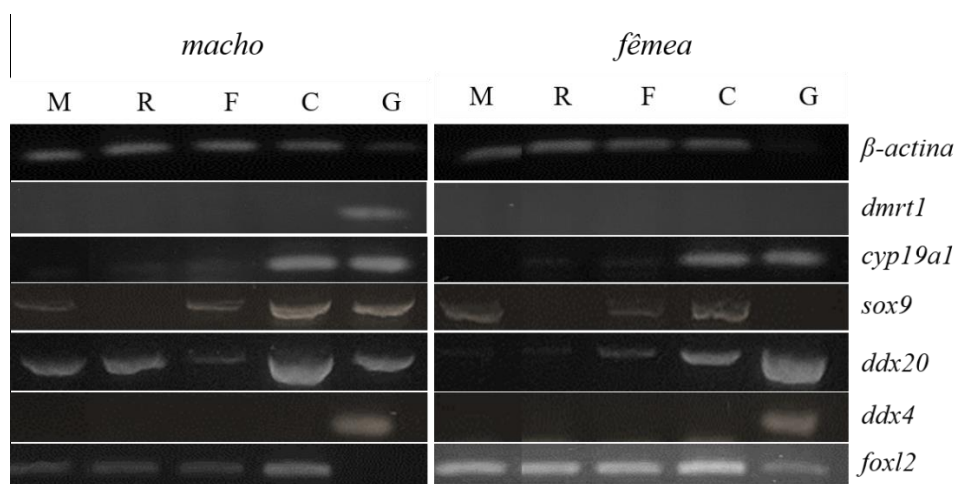


Figura 5. Expressão dos genes em musculo (M), rim (R), fígado (F), cérebro (C) e gônada (G) em adultos machos e fêmeas de *Brycon orbignyanus*.

5. DISCUSSÃO

A partir da análise de expressão gênica tecido específica em adultos foi possível identificar que todos os genes aqui avaliados são expressos nas gônadas e possivelmente estão envolvidos e possuem função importante no processo de diferenciação sexual.

Os genes *ddx4* e *dmrt1* apresentaram expressão apenas em gônada, mostrando assim especificidade no desenvolvimento gonadal da espécie. A expressão de *ddx4* foi observada em ambas as gônadas de macho e fêmea, sendo que na análise semi-quantitativa realizada, não foi possível distinguir se existe diferenças na expressão deste gene nas gônadas de macho e fêmea. O gene *ddx4* é essencial para o desenvolvimento gonadal, ele está diretamente relacionado as células primordiais germinativas (PGCs) (CLARKSON et al., 2019). Tem sido reportado que a expressão desse gene em gônada aumenta conforme o número de células germinativas, podendo ser maior em fêmeas se estas tiverem o desenvolvimento mais rápido (TIAN et al., 2017). Em *Dicentrarchus labrax*, *ddx4* é mais expresso em fêmeas até os estágios iniciais da diferenciação gonadal, sugerindo assim importância para a formação dos ovários (BLÁZQUEZ et al., 2011), aqui, no entanto, se faz necessário uma análise quantitativa para demonstrar se o gene é mais expresso em macho ou fêmea.

Em relação a *dmrt1*, verificou-se maior expressão nos testículos em relação aos ovários, indicando que sua nas gônadas pode ser um bom marcador para identificação do sexo e que deve estar relacionado ao mecanismo de diferenciação sexual em piracanjuba. *dmrt1* é um dos genes mais conservados entre as espécies (SMITH et al., 2009; RAYMOND et al., 2000; KETTLEWELL et al., 2000; RAYMOND et al., 1998), sendo característico de testículo, embora possa ser expresso em níveis baixos em ovários como é o caso de *Astyanax altiparanae*

que apresenta expressão no ovário, no entanto a expressão em testículo é considerada 200x maior que em ovário (ADOLFI et al., 2015).

Os genes *sox9*, *ddx20*, *cyp19a* e *foxl2* foram expressos em outros tecidos além da gônada. A expressão do gene *sox9* foi verificada em músculo, fígado, cérebro de macho e de fêmea. A expressão de *sox9* nas gônadas de macho e fêmea ocorre de forma dimórfica, sendo a expressão na gônada de macho maior que a observada em fêmea pela análise semi-quantitativa. Esse tipo de padrão já foi visto em *cynoglossus semilaevis* (DONG et al., 2011) em *Astyanax altiparanae* (ADOLFI et al., 2015). Esse gene, além da sua relação com a diferenciação sexual, é importante na formação da cartilagem, podendo gerar malformação da mesma na ausência deste (HEALY et al., 1999; BI et al., 1999).

foxl2 foi expresso em todos os tecidos de adulto de macho e fêmea, entretanto, pela análise semi-quantitativa, a expressão em testículo foi de menor intensidade que em ovário, padrão esse visto entre as espécies de peixes (CASTRO et al., 2019; WANG et al., 2004; BARON et al., 2004). Em humanos, sabe-se que a ausência de *foxl2* causa a Síndrome de Blefarofimose (CRISPONI et al., 2001), mostrando a importância desse gene em outras funções além da diferenciação sexual. *foxl2* também é responsável pela ativação da aromatase P450 (*cyp19a1*) em mamíferos (PANNETIER et al., 2006). Em camundongos o gene é considerado um regulador precoce da oôgenese e o seu nocaute provoca a perda total dos folículos e a atresia de oócitos, além de impedir a diferenciação das células da granulosa (OTHOLENGHI et al., 2005; LOFFLER et al., 2003; SCHMIDT et al., 2004). Em caprinos *foxl2* atua como um regulador positivo para *cyp19a*, podendo indicar uma relação com a produção de estradiol (PANNETIER et al., 2006).

Em peixes não se sabe ao certo a sua função ou nível de importância no processo de diferenciação sexual, isso porque esses dados podem variar de uma espécie para outra. Como por exemplo em Tilápia *Oreochromis niloticus* a interrupção de *foxl2* em indivíduos XX gera reversão sexual e a superexpressão leva a degeneração testicular de indivíduos XY, bem como o aumento na produção de estrogênio (WANG et al., 2007). Em *Acanthopagrus schlegeli* o aumento de estradiol conduz ao aumento do nível de transcrição de *foxl2*, e *foxl2* associado a *cyp19a* agem como reguladores do desenvolvimento ovariano na espécie (WU et al., 2008). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a administração de estradiol faz com que ocorra uma regulação positiva da expressão de *foxl2* em machos, sugerindo que esse gene é importante para o desenvolvimento ovariano durante a reversão do sexo (BARON et al., 2004). Em medaka, *foxl2* é considerado importante para o desenvolvimento das células ovarianas, mas não é considerado um determinante (NAKAMOTO et al., 2006).

O gene *cyp19a* foi expresso em quase todos os tecidos, no entanto há uma diferença de intensidade em relação a hipófise, cérebro e gônada, podendo indicar maior atividade do gene nesse eixo. *cyp19a* é um dos genes mais citados na literatura como determinante sexual de fêmeas (SARIDA et al., 2019; HINFRAY et al., 2018; ROMANO et al., 2020; YAN et al., 2019), isso porque ele atua na produção de estradiol que é considerado o principal hormônio na formação do ovário (GUIGUEN et al., 2010; CHESHENKO et al., 2007). No entanto, em *B. orbignyana* a expressão desse gene ocorreu em ambos os sexos incluindo os tecidos analisados e as gônadas. Aparentemente a expressão em testículo tem uma intensidade menor que em ovários, mas para analisar se há diferença ou não na expressão, se faz necessário quantificar esses dados em qPCR.

O gene *ddx20* foi expresso em vários tecidos incluindo gônadas de macho e fêmea. Assim como em genes citados anteriormente, é necessária uma análise quantitativa para determinar o dimorfismo desse gene, no entanto, com a análise semi-quantitativa é possível ver diferença na expressão do ovário e do testículo, sendo verificado em ovário maior expressão deste gene. *ddx20* é um gene importante para o desenvolvimento embrionário e na formação das gônadas em mamíferos, sendo também considerado essencial para o desenvolvimento dos ovários (MOUILLET et al., 2008).

Com isso é possível elencar os genes *dmrt1*, *sox9*, *foxl2* e *ddx20* como bons marcadores sexuais em adultos de piracanjuba, no entanto, isso só pode ser afirmado com certeza após uma análise quantitativa dos mesmos. Como citado anteriormente, por meio da eletroforese é possível identificar diferença na intensidade de expressão, como por exemplo para os genes *dmrt1*, *ddx20*, *sox9* e *foxl2*, por mais que expresso em gônadas de ambos os sexos, a expressão em machos de *sox9* e *dmrt1* é mais intensa que em fêmeas, e em fêmeas a expressão de *ddx20* e *foxl2* é mais intensa que em machos, entretanto, se faz necessário a quantificação desses dados por meio de qPCR.

CAPÍTULO 2

Influência do canibalismo na proporção sexual e caracterização da diferenciação sexual da piracanjuba *Brycon orbignyanus*

Os experimentos apresentados neste capítulo são referentes a avaliação do canibalismo como um fator do desvio da proporção sexual em piracanjuba, e análise do desenvolvimento gonadal em machos e fêmeas durante o processo de diferenciação sexual, visando a caracterização dos estágios iniciais até o fim do processo de diferenciação, quando pode ser realizada a identificação do sexo.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Reprodução da piracanjuba

As matrizes de piracanjuba utilizadas na reprodução foram capturadas nos viveiros de banco genético do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio, Pirassununga, SP). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o "Comitê de Ética e Experimentação Animal" (CEUA/CEPTA - Nº 5450270517).

A seleção dos reprodutores foi feita com base nos caracteres sexuais secundários em fêmeas, como papila genital avermelhada e ventre abaulado nas fêmeas, e a liberação de esperma utilizando leve pressão abdominal em machos. Após a seleção, os indivíduos foram acondicionados em tanques de alvenaria retangulares com aproximadamente 3000 L de água, em sistema de fluxo contínuo de água. Fêmeas e machos foram mantidos separados.

As fêmeas receberam uma dose preparatória de 0,5 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) sucedida por uma dose final de 5,0 mg/kg após um intervalo de 10 horas. Os machos não receberam dosagem devido ao estado de preparação. A extrusão dos oócitos foi realizada manualmente, e a fertilização realizada pelo método a seco. A resposta a indução ocorreu 7 horas após a segunda dose, com temperatura da água de 27°C.

Os oócitos extrusados foram coletados em uma bacia plástica. Em seguida adicionou-se o sêmen e água para a fertilização, sendo estes homogeneizados por movimentos leves. Feito isso, os ovos fecundados foram alocados em incubadoras com renovação de água constante. Após a eclosão, as larvas foram submetidas as condições experimentais.

1.2. Desenho experimental e coleta de amostras

1.2.1. Larvas

As larvas foram divididas em 2 tratamentos distintos, um com larvas criadas isoladamente e outro com larvas agrupadas (Fig.1).

Tratamento 1, larvas de piracanjuba criadas individualmente:

Foram utilizadas 100 larvas de piracanjuba no período de desenvolvimento de um dia após eclosão (2 dias pós fertilização). Estas larvas foram criadas individualmente em recipiente plásticos, com capacidade de 1 litro cada, alocados em tanque de fibra de vidro com cerca de 3000 L de água, em sistema fechado, com filtragem e temperatura controlada em 27°C. As larvas de piracanjuba foram alimentadas com larvas forrageiras de curimatá *Prochilodus lineatus* por um período de cinco dias. No sexto dia (8 dpf), 10 larvas foram coletadas e armazenadas individualmente em microtubo de 1,5 ml a -80°C para análises de expressão gênica.

Tratamento 2, larvas de piracanjuba criadas em grupo:

Este tratamento foi considerado como controle, pois na rotina de pisciculturas as larvas são criadas em grupo, possibilitando a ocorrência de canibalismo. Neste tratamento foram utilizadas cerca de 400 larvas, mantidas em dois recipientes de 10 L, com idade e alimentação similar ao tratamento 1. No sexto dia (8 dpf) de experimento 10 larvas foram coletadas e armazenadas individualmente em microtubo de 1,5 ml a -80°C para realização de análises de expressão gênica. Neste tratamento as condições de criação em ambiente artificial foram mimetizadas, onde o desvio da proporção sexual é observado.

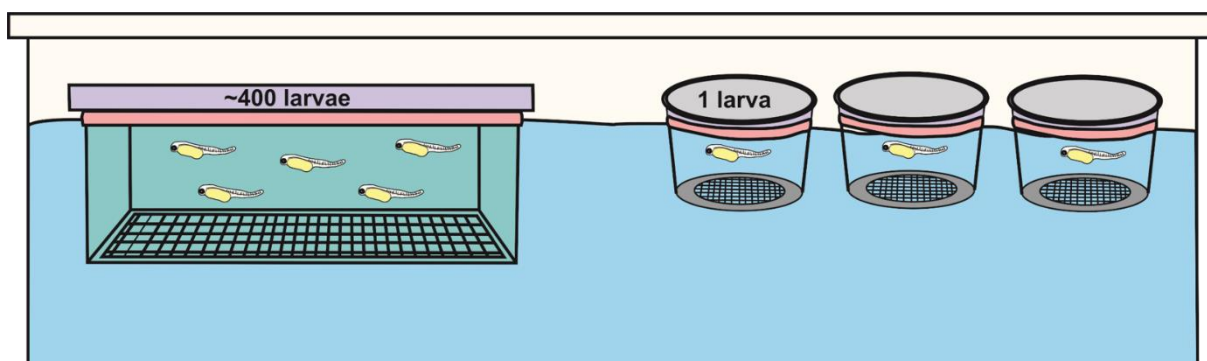


Figura 1. Esquema ilustrativo do sistema de criação para os tratamentos 1 e 2.

1.2.2. Juvenis: Tratamentos 1 e 2

As larvas provenientes dos tratamentos 1 e 2, no sétimo dia pós-eclosão (8 dpf), foram transferidas para tanques de alvenaria de cerca de 8000 L de água. Nesta fase de desenvolvimento, o período mais crítico de canibalismo na espécie é finalizado, permitindo o agrupamento das larvas criadas individualmente. Os animais foram então alimentados com ração comercial (28% de proteína bruta), até atingirem cerca de 18 cm, com cinco meses de idade. Neste período, os animais foram marcados individualmente, de acordo com o tratamento, através de implante de microchip e os dois grupos foram transferidos para um único viveiro escavado com cerca de 350 m².

No décimo segundo mês de idade, os animais foram coletados, eutanasiados e as gônadas foram coletadas e utilizadas para as análises histológica e de expressão gênica.

1.2.3. Juvenis: Acompanhamento da diferenciação sexual

Larvas provenientes da mesma desova daquelas utilizadas nos tratamentos 1 e 2, foram colocadas em tanques de alvenaria e alimentadas como descrito para o experimento de canibalismo, sendo inicialmente com larvas de curimatá e posteriormente com ração. Ao atingirem 18 cm em média foram transferidos para um viveiro escavado de aproximadamente 350 m², para acompanhamento da diferenciação sexual.

As coletas de gônadas foram iniciadas no sexto mês de idade, sendo amostrados mensalmente de 4 a 6 indivíduos por coletada, até o 12º mês. Uma das gônadas coletadas em cada peixe era destinada para análises histológicas e a outra gônada para as análises de expressão gênica. Esse procedimento foi realizado visando a caracterização do período de diferenciação das gônadas nos diferentes tempos de coleta, até a identificação de machos e fêmeas diferenciados.

1.3. Avaliação da expressão de genes relacionados a diferenciação sexual em ovo, larvas e juvenis

Os genes *ddx4*, *ddx20*, *dmtr1*, *sox9*, *cyp19a* e *foxl2* são genes envolvidos na diferenciação sexual e/ou no desenvolvimento gonadal e foram avaliados quanto a expressão em oócito, larvas (8 dpf) e juvenis de piracanjuba. O gene *β -actina* foi utilizado como controle endógeno em todas as análises.

A análise em larvas e oócito teve o intuito de avaliar a expressão de genes provenientes de herança materna e/ou sintetizados pela própria larva. A análise em juvenis foi realizada a fim de verificar o sexo por meio de histologia e comparar com a expressão dos genes obtidos

em gônadas de machos e fêmeas adultos (Capítulo 1), visando compreender quando os genes relacionados a diferenciação sexual iniciam sua expressão nas gônadas durante o desenvolvimento.

1.3.1. Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica

Para a análise da expressão gênica, as amostras foram coletadas e armazenadas a -80°C . O RNA total foi extraído com o uso de Trizol (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante e quantificado através do espectrofotômetro QIAxpert (Qiagen).

Cerca de 1 μg de RNA de cada amostra foi tratado com DNase I (Sigma -Aldrich) e utilizado para a síntese da primeira fita de DNA codante (cDNA), utilizando-se uma mistura de Random primer, dNTP e transcriptase reversa (High-Capacity – Thermo Fisher Scientific), seguindo as orientações do fabricante.

Os cDNAs gerados foram utilizados para a avaliação semi-quantitativa da expressão dos genes envolvidos na diferenciação sexual, citados acima, em relação ao gene endógeno β -actina. Os genes de interesse foram amplificados, usando como molde o cDNA das amostras de piracanjuba. Para as amplificações foram utilizados os *primers* desenhados a partir do alinhamento das sequências gênicas codantes oriundas de outros peixes, depositadas no GeneBank, sendo as sequências dos primers mostrados na Tabela 1 (Procedimentos detalhados no capítulo 1 deste trabalho).

O PCR foi realizado usando *taq* DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific) (0,3 μl por 30 μl de reação), e submetidas a 94°C por 5 min, seguidas de 35 ciclos a 94°C por 45s, 55°C por 30 s e 72°C por 30s, seguidos de 10 min a 72°C . O produto da amplificação foi analisado em gel de agarose (Start BioScience) a 2%, por eletroforese (25 μl por poço).

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados.

Gene	Tamanho dos amplicons em pb	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>ddx4</i>	118	AAGACCACAGGAACTGAGCG	CCCGGTCTCCATGAATGCTT
<i>ddx20</i>	715	AGTGCCATGTGTTTCATTGGT	CGACCAATCCTGTGCATGTA
<i>sox9</i>	621	AGGTGCTGAAGGGCTACGAC	ATGTTGGAGATGACGTCGCTG
<i>foxl2</i>	198	AGACCGAGAGCTTCACCAAAG	TCTCGTAGAAGGGGAACCTGTTG
<i>dmrt1</i>	167	GCAGTTTGTGGATGTCTCGG	TCAGTTTGCACCTCTGGCAC
β -actina	86	CGTGCTGTCTTCCCATCCA	TCACCAACGTAGCTGTCCTTCG
<i>cyp19a</i>	176	GGCACGGCCAGCAACTACTA	TCGTGCATGCCGAGGCACTG

1.4. Histologia

O processamento do material para histologia seguiu os protocolos corriqueiros para análise em microscopia de luz. Em suma, as gônadas fixadas em Bouin, passaram pelos processos de desidratação e diafanização e foram incluídas em paraplast. O material foi cortado em 5 µm em micrótomo (leica RM2235) manual equipado com navalha de aço. Ao final as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. As análises foram realizadas em microscópio óptico (eclipse Ci - Nikon) e fotodocumentação utilizando-se uma câmera Digital Sight DS-Fi1 (Nikon corporation).

1.5. Estatística

Foi utilizado o teste qui-quadrado para analisar a proporção sexual entre machos e fêmeas dos indivíduos de 12 meses dos tratamentos de criação de larvas agrupadas e individualizadas.

2. RESULTADOS

2.1. Larvas

As taxas de sobrevivência das larvas provenientes dos tratamentos 1 e 2 foram de 52% (52 larvas) e 12,7% (51 larvas), respectivamente, para o tratamento com larvas individualizadas e agrupadas.

A análise de expressão gênica semi-quantitativa mostrou que com exceção de *dmrt1* os demais genes são todos expressos na fase larval da piracanjuba. Os genes *β-actina*, *ddx20*, *ddx4*, *cyp19a* e *foxl2* apresentaram expressão em todas as larvas. Somente o gene *sox9* que foi expresso em algumas larvas e em outras não (Possível falha na reação, já que o gene expressa em oócito e em outros tecidos). Na análise da expressão em oócitos (dados não mostrados), apenas *dmtr1* não foi expresso, indicando que o RNA mensageiro deste gene não estaria presente nas amostras. Todos os outros genes possuem herança citoplasmática (Figura 2 - Em alguns indivíduos a amplificação foi muito baixa, desta forma não sendo visualizada na imagem, apenas quando observada diretamente no gel). Importante ressaltar que esses dados são referentes apenas a larvas com 8 dias após a fertilização, a expressão desses genes pode ser diferente anterior ou posterior a esta idade.

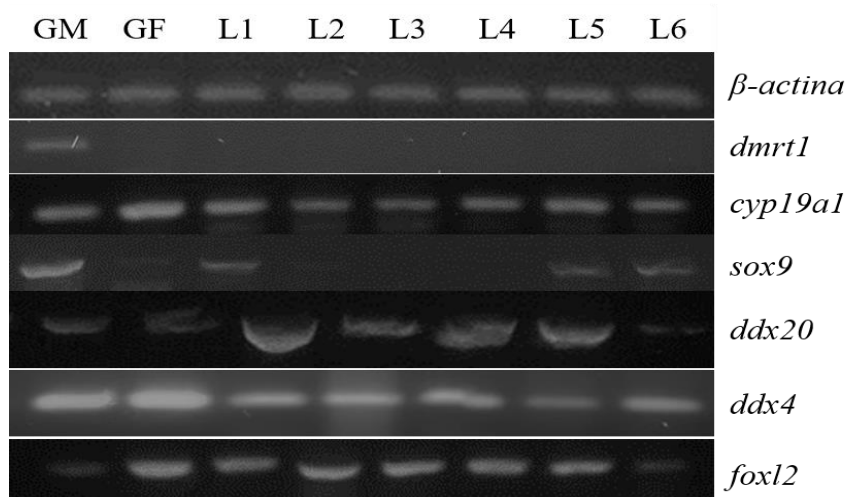


Figura 2. Expressão dos genes em larvas de *Brycon orbignyanus* com 7 dias pós eclosão. **Abreviações:** gônada de macho (GM); gônada de fêmea (GF); larva 1 (L1); larva 2 (L2); larva 3 (L3); larva 4 (L4); larva 5 (L5); larva 6 (L6).

2.1.1. Tratamentos de indivíduos criados em grupo e individualizados

Foram marcados no total 37 indivíduos do tratamento 1 (individualizados) e 37 do tratamento 2 (agrupados). Ao 12º mês, quando os indivíduos foram coletados para a amostragem gonadal, apenas 15 indivíduos do tratamento 1 e 16 do tratamento 2 foram capturados. Foram identificados nove machos e seis fêmeas no tratamento 1 e oito machos e oito fêmeas no tratamento 2. Com base nesses dados a análise de proporção sexual mostrou que não houve diferença significativa entre os sexos, sendo assim considerada a proporção de 1:1 (Qui-quadrado = 0.3145, valor de $p = 0.8545$) entre machos e fêmeas em ambos os tratamentos.

2.2. Diferenciação sexual em juvenis

O acompanhamento mensal dos juvenis foi realizado do 6º até o 12º mês de idade, período em que foi possível identificar fêmeas e machos em desenvolvimento por meio da histologia. O reduzido tamanho das gônadas dificultou a coleta durante esses meses. Em alguns casos, onde a gônada não foi encontrada, os dados dos indivíduos não foram considerados. Além disso a coleta dos indivíduos de seis meses foi feita apenas para a análise histológica, tendo em vista o tamanho reduzido da gônada.

2.2.1. Histologia

A identificação do sexo e das fases de desenvolvimento em que se encontravam os indivíduos foi feita com base nos estudos de Brown-Peterson et al. (2011), Grier e Taylor (1998), Mazzoni et al. (2010) e Cordeiro et al. (2019).

6º mês de idade

Foram coletados cinco indivíduos com média de comprimento padrão e peso de $20,26 \pm 1,16$ cm e $134 \pm 22,74$ g, respectivamente. Foram identificadas duas fêmeas no início do desenvolvimento primário, com poucos oócitos perinucleolares nos ovários e muitas oôgonias e oócitos em diplóteno I (Fig. 3a). Nos outros três indivíduos, as gônadas ainda estavam indiferenciadas. Não foram identificados machos. No entanto, em uma das fêmeas observaram-se alguns cistos de espermatócitos e alguns espermatozoides pelas gônadas (Fig. 3b). Essas gônadas tinham a estrutura de filamento fino e de aparência flácida (Fig. 3d-f).

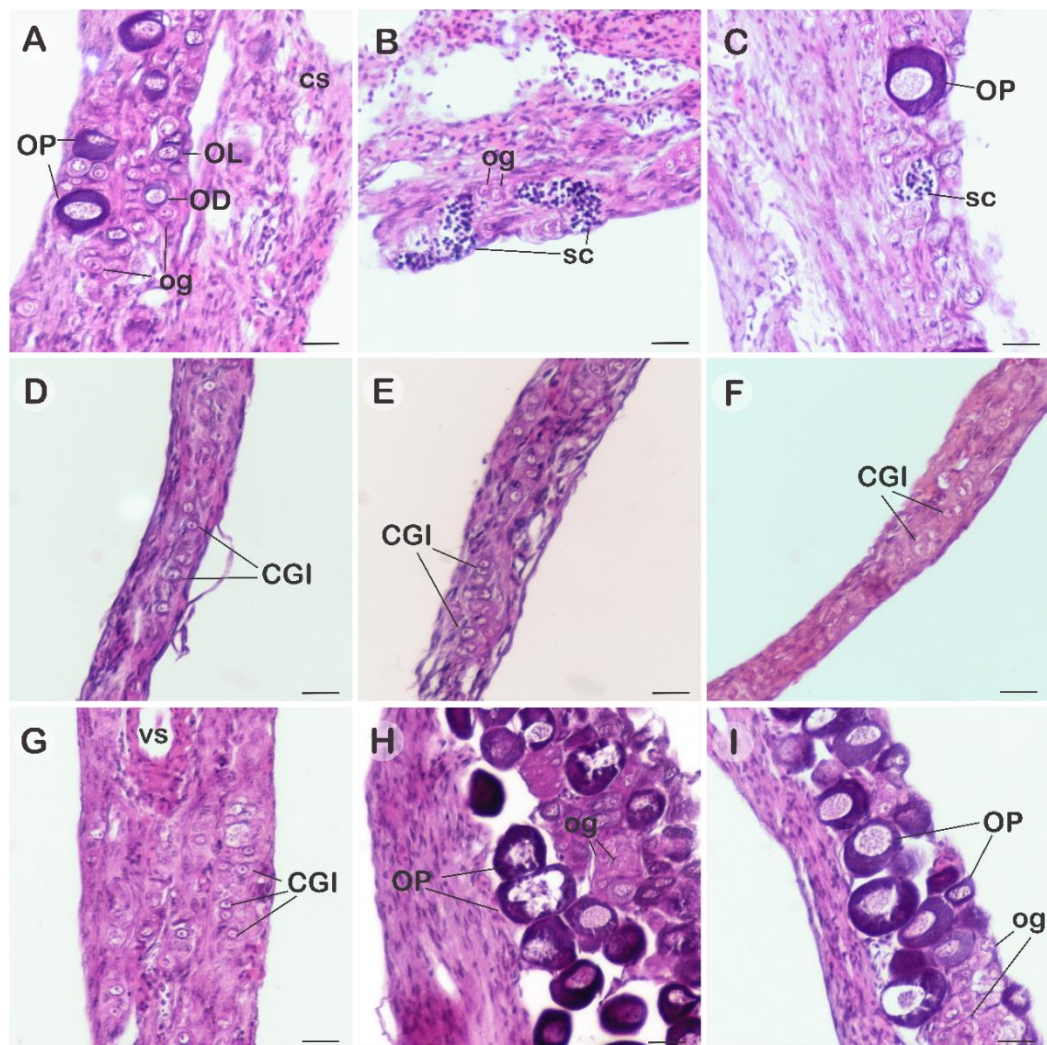


Figura 3. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 6 meses de idade. A-C. Ovário com oócitos em crescimento primário (OP), oôgonias (og) em diferentes fases e cistos de espermatócitos (sc); D-G. Gônadas indiferenciadas com a presença de células germinativas indiferenciadas (CGI); H e I. Ovário em desenvolvimento inicial, presença de oogônias (og) e oócitos perinucleolares (OP). **Abreviações:** oócito em leptóteno (OL); oócito em diplóteno (OD); células somáticas (cs); vaso sanguíneo (vs). **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Barras de escala:** 50 μ m.

7º mês de idade

Foram capturados e analisados quatro indivíduos, a média de comprimento padrão foi de $19,6 \pm 1,22$ cm e de peso foi $128,75 \pm 28,68$ g. Dois foram identificados como fêmeas, um como macho e outro estava indiferenciado (Fig. 4C). O macho não estava bem definido, foi assim identificado pela presença poucos cistos de espermatócitos encontrados em algumas partes da gônada, entretanto sua maior parte tinha características de indiferenciada (Fig. 4D). As células vistas no ovário foram oogônias e oócitos perinucleolares que são característicos do desenvolvimento primário (Fig. 4A-B). O formato das lamelas ainda não estava evidente, e a gônada estava no início da proliferação de células germinativas.

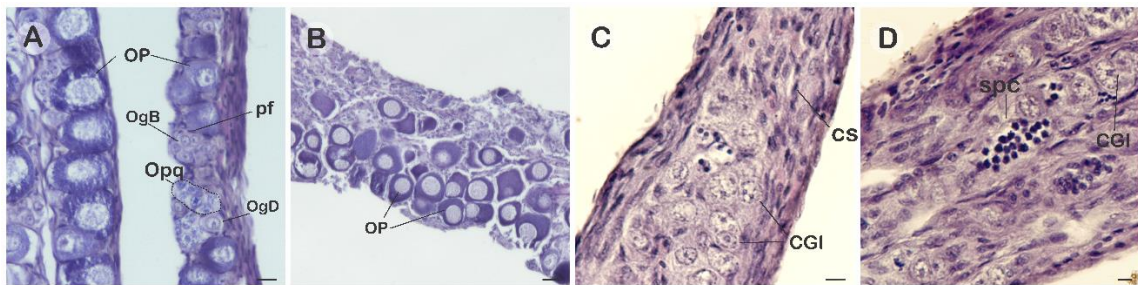


Figura 4. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 7 meses de idade. A. e B. Ovários com oócitos em crescimento primário (OP) e oogônias em diferentes fases; C. Gônada indiferenciada; D. Testículo com cisto de espermatócitos (spc) e células germinativas indiferenciadas (CGI); **Abreviações:** oogônias B (OgB); oogônia diferenciada (OgD); oócito em paquíteno (Opq); célula pré-folicular (pf). **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Barras de escala:** 50 μ m (A, C, D); 100 μ m (B).

8º mês de idade

Na terceira coleta foram capturados 3 indivíduos, a média de comprimento padrão foi $18,3 \pm 0,84$ cm e de peso foi $88,75 \pm 9,12$ g. Os indivíduos 2 e 3 foram identificados como fêmeas e o indivíduo 1 indiferenciado. Os ovários estavam em desenvolvimento inicial, com a presença de oogônias e oócitos perinucleolares, sendo que uma das gônadas estava com maior formação de oócitos (Fig. 5).

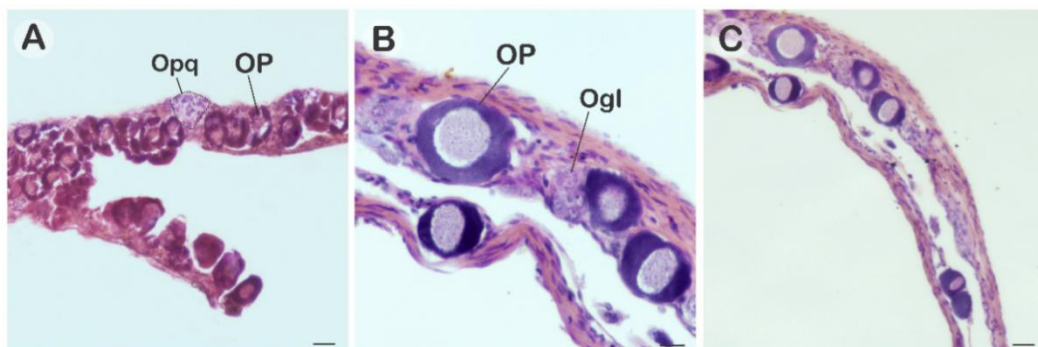


Figura 5. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 8 meses de idade. A. Ovário com oócitos em crescimento primário (OP), oócitos em paquíteno (Opq); B e C. Ovário com alguns oócitos primários (OP) e oogônias em diferentes fases distribuídas por toda a gônada. **Abreviações:** oogônia indiferenciada (Ogl); oócito em paquíteno (Opq). **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Barras de escala:** 50 μ m (B); 100 μ m (A, C).

9º mês de idade

Na quarta coleta foram coletados quatro indivíduos, a média de comprimento padrão foi de $20,4 \pm 1,63$ cm e de peso foi $125 \pm 33,16$ g. Todos foram identificados como fêmeas pois havia presença de oócitos em desenvolvimento primário, assim como nas demais coletas (Fig. 6). Neste momento as gônadas estavam estruturalmente mais desenvolvidas, com as lamelas ovígeras já formadas (Fig. 6). Em uma delas foram vistos alguns poucos oócitos aleatoriamente distribuídos pela gônada, a maior parte das células eram indiferenciadas. A gônada era fina e apresentava flacidez. Apesar de apresentarem espermatozoides, a quantidade de espermatócitos era superior, considerado assim como um ovário. (Fig. 6G-I)

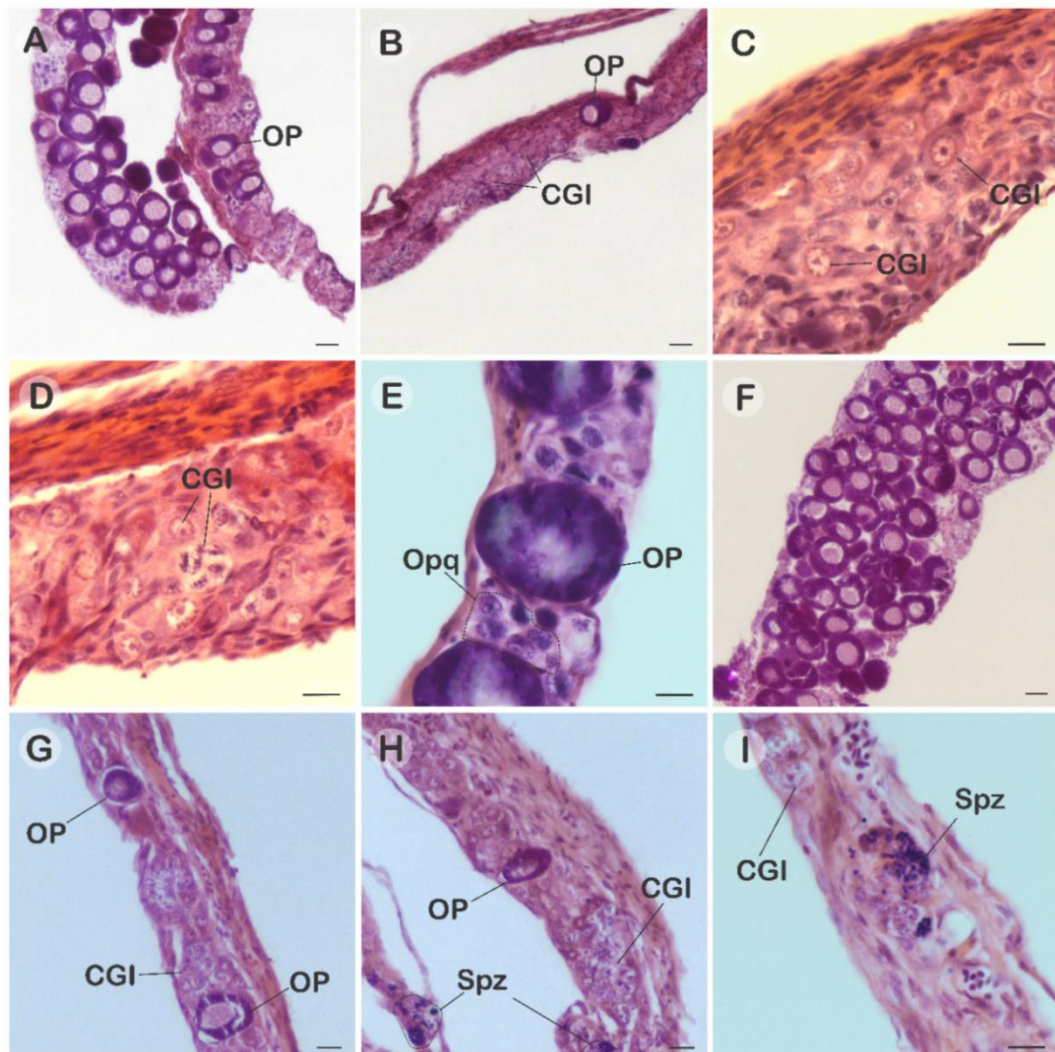


Figura 6. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 9 meses de idade. A-D. Indivíduo 1 com oócitos em crescimento primário (OP) e células germinativas indiferenciadas (CGI); E. Indivíduo 3, com oócitos em crescimento primários (OP) e oócitos em paquíteno (Opq); F. Indivíduo 2, ovário com muitos oócitos em crescimento primário (OP); G-I. Indivíduo 4, oócitos em crescimento primário (OP), células germinativas indiferenciadas (CGI) e espermatozoides (Spz). **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Barras de escala:** 50 μ m (C-E, G-I); 100 μ m (A, B, F).

10º mês de idade

Na quinta coleta foram coletados cinco indivíduos, a média de comprimento padrão foi de $20,4 \pm 2,44$ cm e a de peso foi $112 \pm 45,35$ g. Três foram identificados como fêmeas, um como macho e outro ainda indiferenciado. Das fêmeas, duas estavam mais desenvolvidas, com oócitos em crescimento primário e em prófase I, havia também muitas oogônias (Fig. 7A-B, K-L). O outro ovário estava com apenas alguns oócitos espalhados pela gônada e muitas oogônias (Fig. 7C-E). O macho estava em desenvolvimento inicial, sendo possível identificar alguns cistos de espermatócitos e espermátides, assim como espermatozoides, no entanto, a maioria das células germinativas presentes eram espermatogônias (Fig. 7F-H). No indivíduo indiferenciado a maioria das células eram células germinativas indiferenciadas não sendo possível identificar se eram oôgonias ou espermatogônias (Fig. 7I-J).

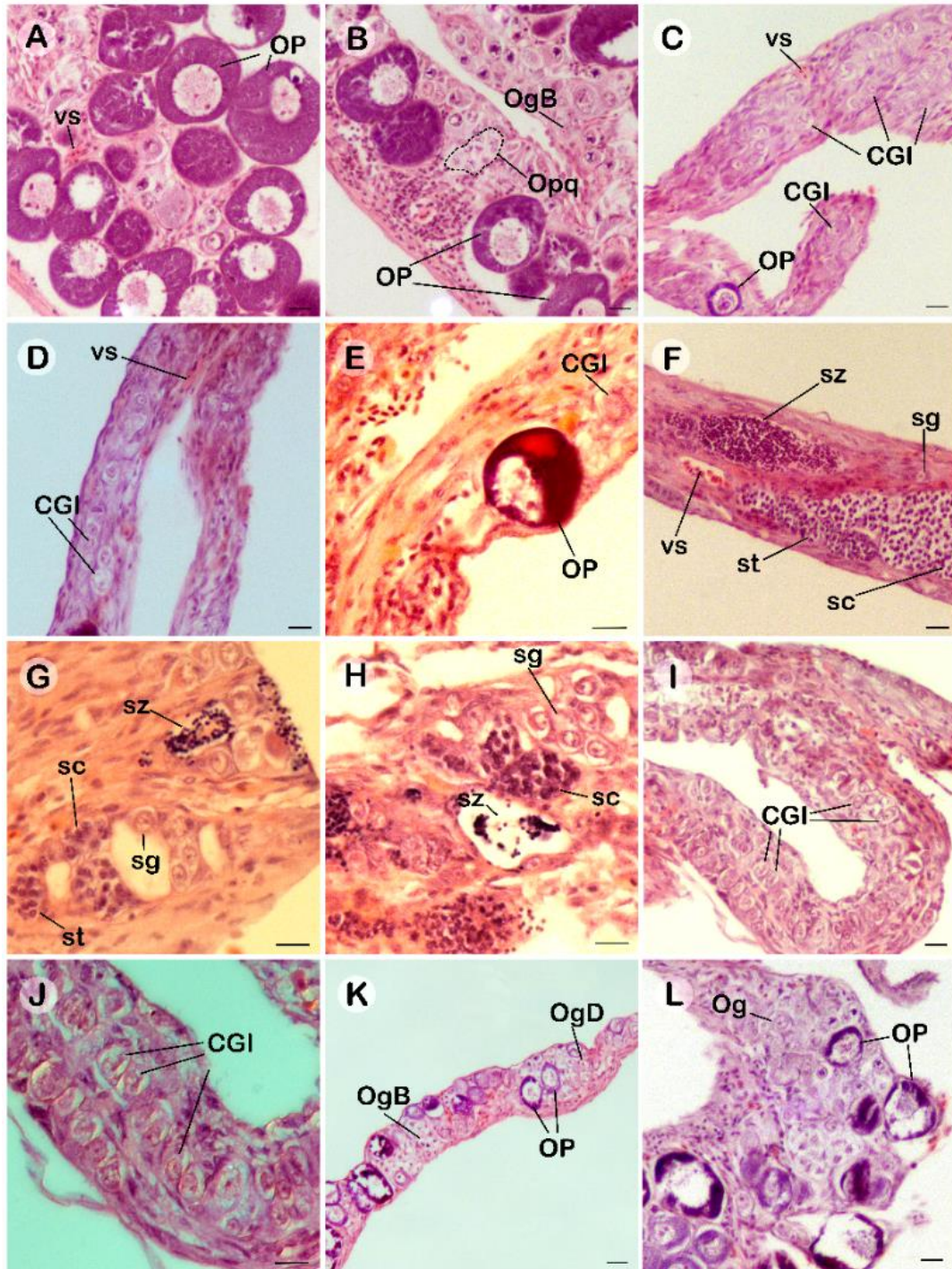


Figura 7. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 10 meses de idade. A e B. Indivíduo 1, com oócitos em crescimento primário (OP), oócitos em paquíteno (Opg) e oogônias B (OgB); C-E. Indivíduo 2, com oócitos em crescimento primários (OP) e células germinativas indiferenciadas (CGI); F-H. Indivíduo 3, testículo com espermatogônias (sg), cistos de espermatócitos (sc), espermatídes (st) e espermatozoides (sz) no lúmen; I e J. Indivíduo 4, indivíduo indiferenciado com células germinativas indiferenciadas (CGI); K e L. Indivíduo 5, ovário com presença de oogônias e oócitos primários. **Abreviações:** vaso sanguíneo (vs); oogônia diferenciada (OgD); oogônia (Og). **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Barras de escala:** 50 μ m (A-J, L); 100 μ m (K).

11º mês de idade

Na sexta coleta foram coletados quatro indivíduos, sendo a média de comprimento padrão $21,7 \pm 0,78$ cm e de peso $170 \pm 21,79$ g. Foram identificados uma fêmea e três machos. A fêmea estava em desenvolvimento inicial, havia muitas oôgonias, oócitos em prófase I, e predominância de oócitos em crescimento primário (Fig. 8A-C). Um dos machos estava em desenvolvimento inicial com muitas espermatogônias (Fig. 8D-E) e os demais apresentavam cistos de espermatócitos, espermatídes, espermatozoides no lúmen, assim como várias espermatogônias (Fig. 8F-I).

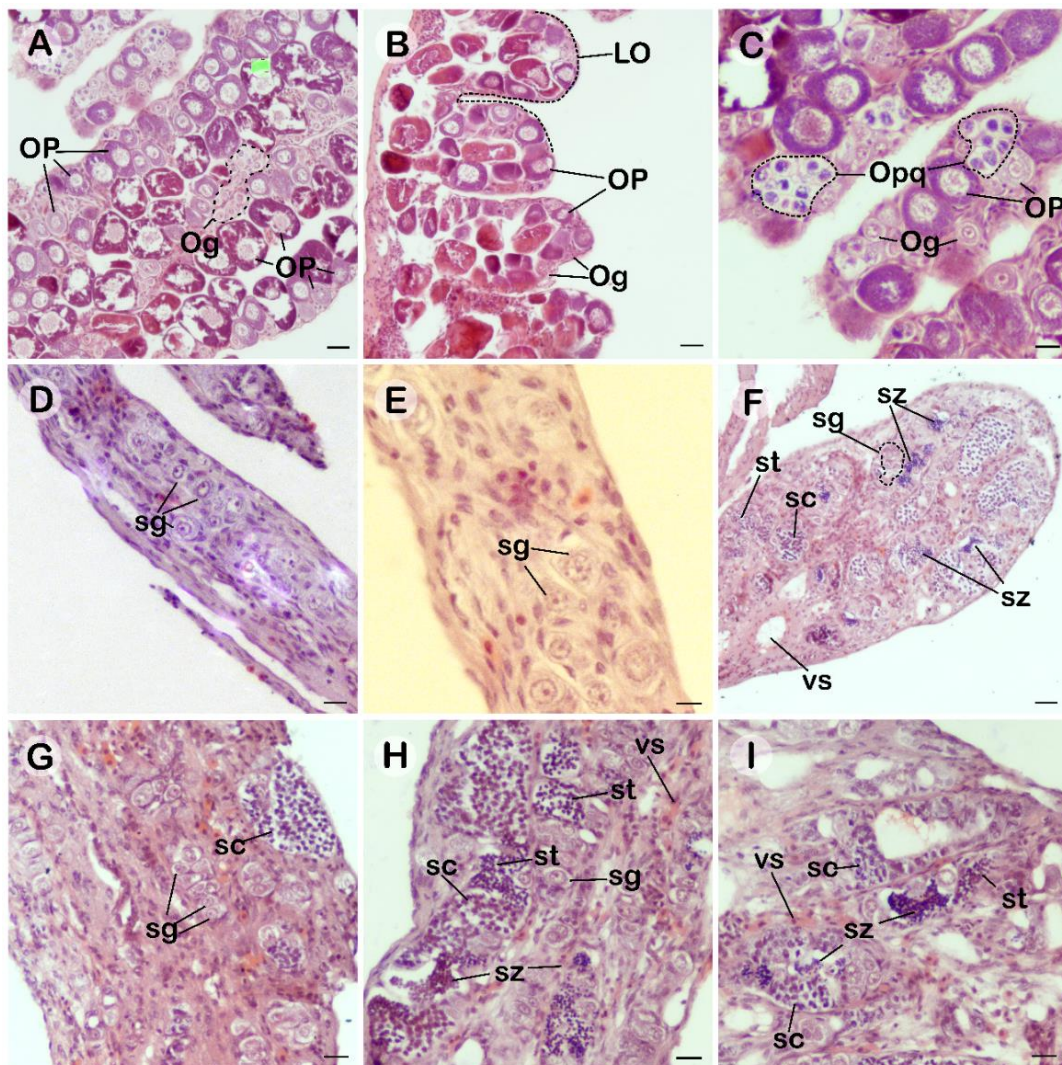


Figura 8. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 11 meses de idade. A-C. Indivíduo 1, ovário com oócitos em crescimento primário (OP), oócitos em paquíteno (Opq) e oogônias (Og) ocupando as lamelas ovígeras (LO); D e E. Indivíduo 2, testículo com a presença de espermatogônias (sg); F e G. Indivíduo 3, testículo com espermatogônias (sg), cistos de espermatócitos (sc), espermatídes (st) e espermatozoides (sz) no lúmen; H e I. Indivíduo 4, Testículo com espermatogônias (sg), cistos de espermatócitos (sc), espermatídes (st) e espermatozoides (sz) no lúmen. **Abreviações:** vaso sanguíneo (vs). **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Barras de escala:** 50 μ m (C, E, G-I); 100 μ m (A, B, D, F).

12° mês de idade

Para essa análise foram utilizados indivíduos provenientes dos tratamentos 1 e 2 do experimento realizado com larvas. Foram analisados 31 indivíduos, sendo 17 machos e 14 fêmeas. A média do comprimento padrão e peso dos indivíduos foi de $21,1 \pm 1,43$ cm e $151,1 \pm 29,22$ g, respectivamente.

A partir da análise histológica foi possível identificar as fases de desenvolvimento dos indivíduos. A maioria das fêmeas estava em desenvolvimento primário, com a presença de oócitos primários, oôgonias, e oócitos em fase de diplóteno I. Alguns ovários tinham uma conformação diferente, cuja quantidade de oócitos vistos era menor que nas demais, sendo a maioria das células, oogônias (Fig. 9J-L).

Os machos foram identificados, principalmente, pela presença de espermatozoides. Mesmo em indivíduos com poucos cistos formados, foi possível visualizar alguns espermatozoides. Foram identificadas duas diferentes fases de desenvolvimento testicular, o desenvolvimento inicial (Fig. 9A-B) e intermediário (Fig. 9C-E). Os indivíduos cujos testículos foram caracterizados como em desenvolvimento inicial tinham pouca formação de cistos de espermatócitos e de espermátides, e mesmo que fosse possível visualizar espermatozoides, esses eram escassos ao longo da gônada. Os indivíduos com maior formação de cistos de espermatócitos, espermátides e presença de espermatozoides foram considerados como em desenvolvimento intermediário. Muitos dos indivíduos caracterizados nessa fase, apresentavam descontinuidade avançada em várias regiões do epitélio germinativo, contendo assim, grande volume de espermatozoides no lúmen (Fig. 9D-F).

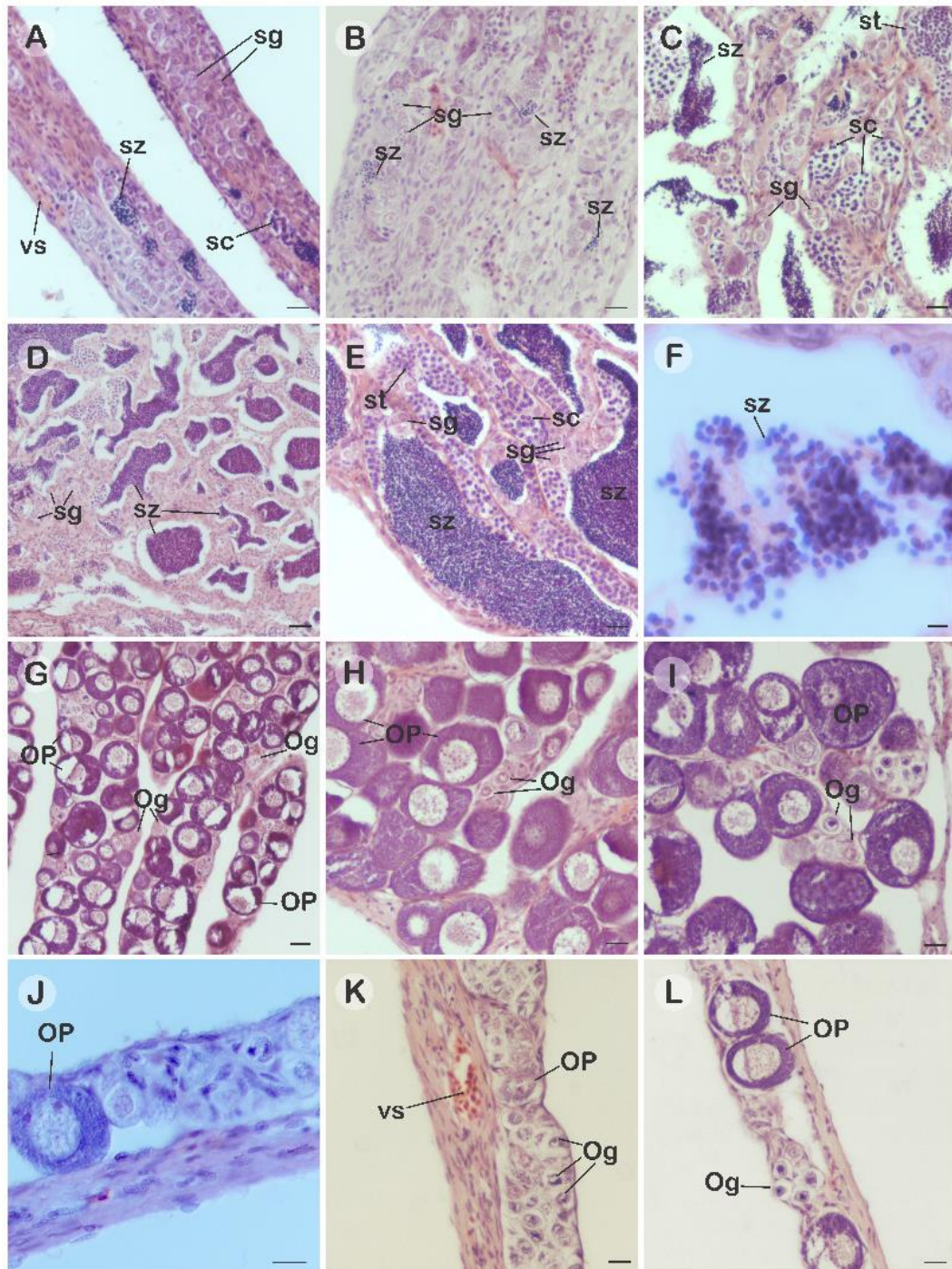


Figura 9. Desenvolvimento gonadal em indivíduos de 12 meses de idade. A-B. Testículos em desenvolvimento inicial, com muitas espermatogônias (sg), alguns cistos de espermatócitos (sc) e espermatídes (st) além de alguns espermatozoides (sz) no lúmen; **C-F.** Testículos em desenvolvimento intermediário, muitos cistos de espermatócitos (sc), espermatídes (st) e muitos espermatozoides (sz) no lúmen, assim como muitas espermatogônias (sg) por toda a gônada; **G-L.** Ovários em desenvolvimento inicial com oócitos perinucleares (OP) e muitas oogônias (Og). **Abreviações:** vaso sanguíneo (vs). **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Barras de escala:** 20 µm (F); 50 µm (A-C, E, G-L); 100 µm (D).

Dos 31 indivíduos analisados, três apresentaram gônadas com células das linhagens germinativas feminina e masculina. Nelas havia grande volume de espermatozoides e células

da linhagem espermatogênica, além de alguns oócitos em crescimento primário. Algo semelhante foi visto em um dos indivíduos com 6 e 9 meses, no entanto, não estava tão evidente, pois a quantidade de oócitos e espermatozoides era pequena (Fig. 10).

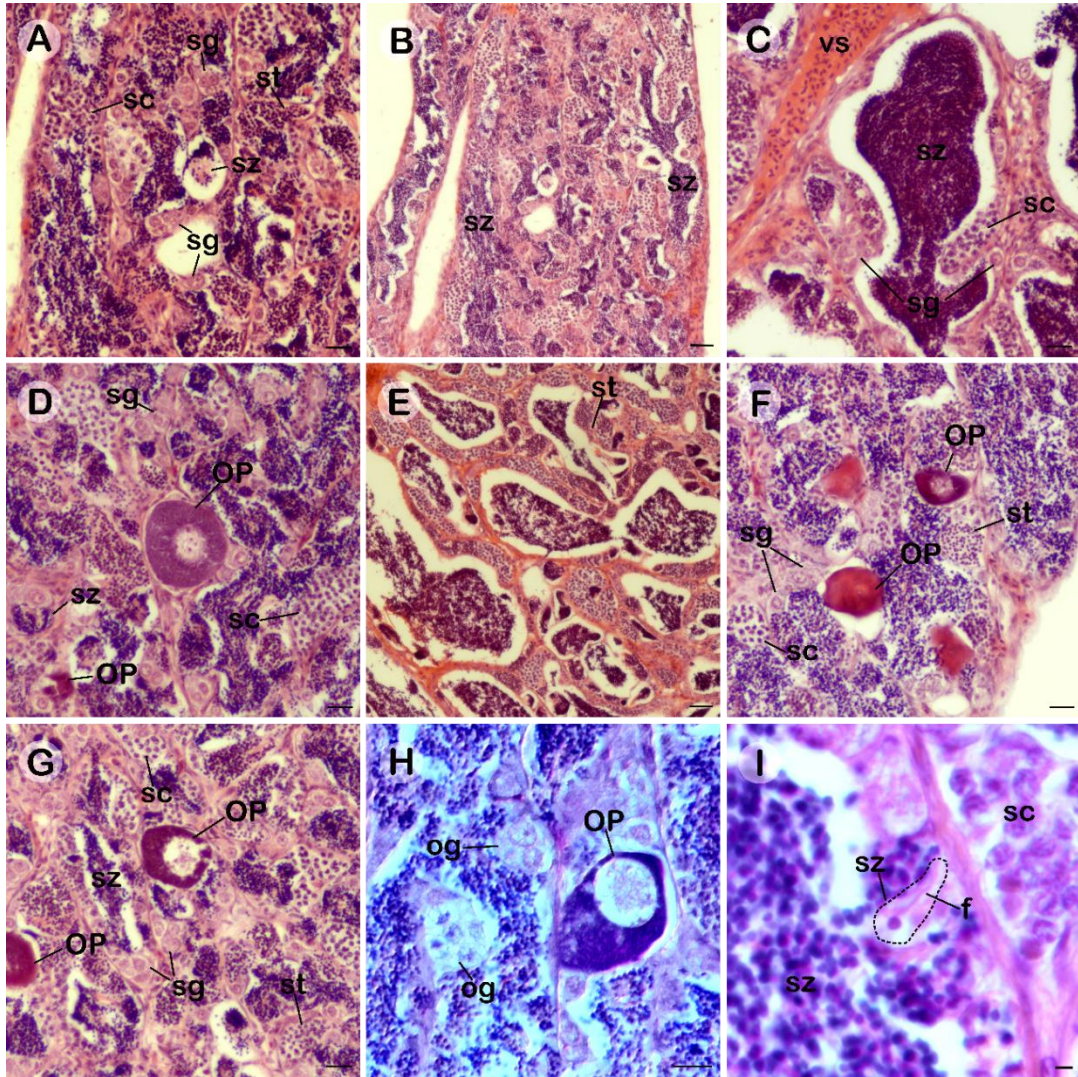


Figura 9. Indivíduos com células de linhagem espermatogônica e oócitaria. São observados Cistos de espermatócitos (sc) e espermatídeos (st), grande volume de espermatozoides (sz) no lúmen e, ao longo da gônada, alguns oócitos primários (OP). **Abreviações:** vaso sanguíneo (vs); espermatogônia (sg); flagelo (f). **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Barras de escala:** 20 µm (I); 50 µm (A, C, D, F-H); 100 µm (B, E).

2.2.2. Expressão gênica

A expressão dos genes observadas nas gônadas durante o desenvolvimento gonadal, de acordo com idade e sexo, foram tabuladas (Tabela 2) para a análise. As figuras dos géis são mostradas no Adendo1.

Nos indivíduos de 7 meses os genes *β-actina*, *cyp19a* e *ddx20* foram expressos em todos os juvenis, sendo que as fêmeas aparentemente apresentaram maior nível de expressão de *ddx20*

que machos. Para *sox9*, não foi observada a expressão em nenhum dos juvenis. Para *foxl2* foi observada a expressão nas fêmeas e não em machos e a expressão de *ddx4* não foi detectada no indivíduo 3 (possível falha na reação). Para *dmrt1* foi observada uma baixa intensidade da banda apenas na fêmea 4 e não foi detectada a expressão em nenhum dos machos.

Na coleta do 8º mês não foi observado nenhum macho. A expressão de *dmrt1* e *sox9* não foi observada em nenhum dos juvenis. *β-actina*, *cyp19a*, *foxl2* e *ddx4* foram expressos em todos os indivíduos. Não foi detectada a expressão de *ddx20* na fêmea 2 (possível falha de reação). Nos indivíduos de nove meses os genes *β-actina*, *ddx20*, *cyp19a* e *ddx4* foram expressos em todos os indivíduos. Para *dmrt1*, baixa intensidade da banda foi detectada nas fêmeas 1 e 2, enquanto *sox9* e *foxl2* não foram expressos na fêmea 3.

Nos indivíduos de dez meses os genes de *β-actina*, *ddx20*, *ddx4* e *sox9* foram expressos em todos os indivíduos, sendo observado em *sox9* uma banda fraca de expressão na fêmea 4. *cyp19a* e *foxl2* não foram expressos no macho 3 e a expressão de *sox9* e *foxl2* foi detectada em baixo nível no macho 4. A expressão de *ddx20* foi bem evidente nas fêmeas 1 e 5. *dmrt1* foi expresso nas fêmeas 1 e 2 e no macho 3, sendo bem mais evidente no macho.

Nos indivíduos de onze meses, os genes *β-actina*, *ddx20* e *ddx4* apresentaram expressão em todos os indivíduos. Os genes *cyp19a*, *sox9* e *foxl2* não apresentaram expressão no macho 3 e *dmrt1* foi expresso apenas na fêmea 1 e no macho 3. A expressão de *ddx20* na fêmea 1 mostrou-se mais intensa que nos demais, semelhante a expressão de ovário de adulto. Em *sox9*, a expressão na fêmea 1 e no macho 4 foram mais intensas, semelhante a expressão mostrada em testículo de adulto.

Nas análises com os indivíduos de 12 meses, selecionou-se seis animais, três machos e três fêmeas, identificados por meio da histologia. *β-actina* e *ddx4* foram expressos em todos os indivíduos, sem apresentar diferença na intensidade de expressão. *ddx20* também foi expresso em todos os indivíduos, no entanto, a expressão foi mais intensa em fêmeas que em machos. Ao contrário, *cyp19a* que foi expresso em todos os indivíduos, no entanto a expressão foi visualmente mais intensa em machos. *foxl2* teve expressão mais intensa em fêmeas e em dois dos machos não houve expressão.

Tabela 2. Genes expressos em juvenis durante o período de 7 a 12 meses de idade.

Idade	Peixe	Sexo	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>	<i>foxl2</i>	<i>ddx20</i>	<i>ddx4</i>	<i>cyp19a</i>
7 meses	1	♂	-	-	-	+ -	+	+
	2	♀	-	-	+	+	+	+
	3	*	-	-	-	+ -	-	+
	4	♀	+	-	+	+	+	+
8 meses	1	*	-	-	+	++	+	+
	2	♀	-	-	+ -	-	+	+
	3	♀	-	-	+	+	+	+
9 meses	1	♀	+ -	++	+	++	+	+
	2	♀	+ -	+ -	+	+ -	+	+
	3	♀	-	-	-	+	+	+ -
	4	♀/♂	-	+	+	+	+	+
10 meses	1	♀	+	+	++	++	+	+
	2	♀	+	+	+	++	+	+
	3	♂	+	+	-	+ -	+	+ -
	4	*	-	+ -	+ -	+ -	+	+
	5	♀	-	+ -	+	++	+	+
11 meses	1	♀	+ -	++	++	++	+	+
	2	♂	-	+ -	+	++	+	+
	3	♂	+ -	-	-	+	+	+ -
	4	♂	-	++	+	+	+	+
12 meses	1	♀	-		+	++	+	+ -
	2	♀	-		+	++	+	+ -
	3	♀	-		++	++	+	+ -
	4	♂	+		-	+	+	++
	5	♂	++		+ -	+	+	++
	6	♂	+		-	+ -	+	+

Legenda: (*) indiferenciado; (♀) fêmea; (♂) macho; (-) sem expressão; (+) expressão; (++) expressão intensa; (+-) expressão baixa. O nível de expressão é baseado na expressão encontrada em adultos.

3. DISCUSSÃO

As análises de expressão gênica realizadas em oócitos, larvas e juvenis foram importantes para se obter informações da ocorrência das expressões em diferentes fases do desenvolvimento, que antecedem a maturidade sexual em piracanjuba. Sendo assim, as análises em larvas e oócitos foram realizadas visando a identificação de quais desses genes seriam expressos desde o início da vida desses indivíduos. Nos juvenis, as análises de expressão gênica, juntamente com as análises histológicas, permitiram esclarecer a forma em que esses genes se comportam durante a fase de diferenciação sexual.

As análises realizadas em larvas, demonstraram que, com exceção de *dmrt1*, todos os genes são expressos em machos e fêmeas. Como visto no capítulo 1, a maioria dos genes avaliados também são expressos em outros tecidos além das gônadas. Dessa forma a identificação do sexo precoce no período larval aparenta ser difícil em piracanjuba, principalmente quando a larva inteira é utilizada para extração de RNA, uma vez que a expressão avaliada pode ser proveniente de outros tecidos que não a gônada. No entanto, alguns genes, como o *ddx4*, *ddx20* e *sox9*, apresentaram expressões variadas podendo ser potenciais alvos de estudo da expressão em larvas, utilizando-se o método quantitativo. O gene *dmtr1* não poderia ser utilizado uma vez que não é expresso em larva (8dpf).

O gene *ddx4* é o único expresso em larvas que é exclusivamente encontrado em gônada, no entanto é um gene expresso em células germinativas de forma geral, sejam elas PGCs, oogônias ou espermatogônias (CLARKSON et al., 2019; RAZ, 2000). O gene é de herança materna apresentando expressão também em oócitos. Esse resultado é semelhante aos obtidos para zebrafish em outros trabalhos (KNAUT et al., 2000; YOON et al., 1997). Esse gene possui diferentes variantes que atuam de forma diferente durante todo o desenvolvimento do indivíduo, sendo que alguns deles podem ser mais expressos em fêmea e outros em macho (KROVEL & OLSEN, 2004). Em relação ao canibalismo e a proporção sexual, não foi observado influência direta, até porque a proporção entre os tratamentos não apresentou diferença.

Como foi citado acima, *dmrt1* não é expresso em larvas e em oócitos. Não se sabe ao certo quando este começa a ser expresso, se antes ou depois da formação e diferenciação gonadal, pois as análises de expressão gênica realizadas em juvenis iniciaram aos sete meses de idade dos indivíduos e nesse período *dmrt1* foi expresso em um dos ovários identificados, dessa forma seria necessário a realização de análises antes do sétimo mês de idade. Porém, a

expressão deste gene foi se tornando mais evidente a partir do 9º mês de desenvolvimento e apresentando os padrões observados em macho e fêmea de adultos no 12º mês. Antes disso, a expressão de *dmtr1* foi variada entre os indivíduos, sendo a expressão com grande ocorrência em gônadas classificadas como fêmeas.

Em juvenis a análise foi realizada por meio de duas ferramentas, a expressão gênica e a histologia, o que permitiu a comparação dos dados em relação ao sexo dos indivíduos e a fase de desenvolvimento.

Nos juvenis de 7 e 8 meses os genes expressos foram principalmente relacionados ao desenvolvimento ovariano e genes que são expressos em ambos os sexos (*foxl2*, *ddx20* e *ddx4*). No entanto, as gônadas nestas fases de desenvolvimento não expressaram outros genes característicos de diferenciação sexual, como o *sox9* e *dmtr1*, sendo o último observado em apenas um indivíduo (fêmea) até o oitavo mês. Estes dados indicam que estas gônadas ainda poderiam estar em processo de diferencial sexual, mesmo com a classificação histológica em fêmea ou macho. Apesar de apenas um indivíduo macho ser encontrado no 7º e 8º mês, *foxl2* foi expresso em todas as fêmeas identificadas pela histologia, podendo ser um potencial indicador da diferenciação gonadal neste período. Na expressão de *foxl2* em gônadas de adultos foi verificado dimorfismo de expressão entre machos e fêmeas, sendo observado maior nível de expressão nas fêmeas. Nestas coletas foram obtidos dois indivíduos indiferenciados, sendo observada a expressão em um deles. Este resultado, pode ser um indicativo que nesta fase a expressão de *foxl2* poderia conduzir à diferenciação de gônada feminina. No entanto, um número maior de indivíduos precisaria ser avaliado nesta fase

No mês 9, *sox9* passou a ser expresso nos indivíduos, e *dmrt1* passou a ser expresso com mais frequência que nos meses anteriores. Eles estavam em ovários e na gônada que apresentou células das linhagens germinativas feminina e masculina. Nesta todos os genes foram expressos. Somente a partir do mês 10 foram identificados testículos bem definidos, estes também apresentaram expressão de genes relacionados a ambos os sexos, no entanto, verificou-se maior nível de expressão de *foxl2* e *ddx20* em fêmeas, como em gônadas de adulto.

Durante o mês 11 a maioria dos indivíduos foram identificados como machos, estes expressaram genes referentes ao sexo masculino e ao sexo feminino. A expressão de *ddx20* e *foxl2* foi mais intensa em ovários que em testículos, assim como no mês anterior. Nesta fase, foram observadas a expressão de *sox9* e *dmrt1* em ovário. Do 9º ao 11º mês, apesar das gônadas serem classificadas como masculina e feminina, a expressão de genes relacionados ao sexo parece não ser tão específica quanto a *dmtr1*. Porém, já pode ser verificado um padrão similar

entre gônadas de fêmeas juvenis e de fêmea adulta, para as expressões de *foxl2* e *ddx20*, com maior nível de expressão em fêmeas.

Na última coleta realizada ao 12º mês, foram comparadas as expressões dos genes em gônadas provenientes de machos e fêmeas. Neste período, foi verificado que machos e fêmeas já apresentam um padrão de expressão dos genes avaliados de acordo com aqueles observados nas gônadas de machos e fêmeas adultos. O gene *dmtr1* só foi expresso em testículos e não ovários. Os genes *foxl2* e *ddx20* apresentaram maior expressão nos ovários que testículos. Ainda falta a avaliação da expressão de *sox9* nesta fase para comparar com o adulto.

Corroborando com os dados de expressão gênica que ocorreram em ambos os sexos vindos do 7º ao 11º mês, que eram bem distintos das expressões em adultos, uma outra característica importante foi encontrada durante o desenvolvimento de juvenis de piracanjuba, a presença de células germinativas masculinas e femininas em uma mesma gônada. Algumas gônadas aparentavam ser ovários e tinham cistos espermatogoniais ou espermatozoides em algumas regiões. Em outras, as gônadas eram semelhantes a testículos bem desenvolvidos e alguns oócitos eram vistos ao longo e sua extensão. Essa característica pode estar relacionada a diferentes fatores, e pode justificar o padrão de expressão diferente do encontrado em adultos.

Uma hipótese que justifica esse padrão é de que a espécie pode ser hermafrodita juvenil, sendo assim as gônadas encontradas com as duas linhagens celulares poderiam estar em transição sexual, onde a gônada passa de ovário para testículo. Esse tipo de desenvolvimento é visto em zebrafish, onde inicialmente os indivíduos desenvolvem ovários em desenvolvimento inicial e posteriormente parte dos indivíduos passam pelo processo de transformação gonadal, formando assim um testículo (RODRÍGUEZ-MARÍ et al., 2010; WANG et al., 2007).

A falta de padrão durante os meses estudados e entre os indivíduos é semelhante à ocorrida em zebrafish durante o período de diferenciação sexual. No início do desenvolvimento em zebrafish, quando as gônadas ainda não passaram de ovário para testículo, a expressão de *dmrt1* é observada, assim como verificado em juvenis de Piracanjuba. Esse padrão pode indicar que *dmrt1* é um gene responsável pela diferenciação dos testículos nas espécies (JORGENSEN et al., 2008). Além disso o padrão de desenvolvimento gonadal entre as espécies é semelhante, visto que a formação dos testículos tem início em gônadas que ainda apresentam oócitos, por conta disso são conhecidas como gônadas intersexuais (WANG et al., 2007).

Além da presença de oócitos e células espermatogoniais na mesma gônada, outras características que podem indicar essa transição são vistas, como por exemplo o formato das gônadas e a quantidade oócitos que diminui a partir do 9º mês, quando comparado aos ovários coletados no 7º mês. A sequência de aparecimento das células de linhagem espermatogênica

também demonstram um certo padrão, inicialmente essas células eram minoria em relação aos oócitos, e nos indivíduos de 12 meses de idade os oócitos eram minoria, aparecendo em testículos bem desenvolvidos.

Outra característica é que durante todo o acompanhamento, até o décimo segundo mês, todos os ovários encontrados continham apenas oócitos primários, ou seja, o desenvolvimento destes estava limitado apenas ao desenvolvimento inicial. No entanto, essa característica pode não estar relacionada a transição gonadal, pode ser que nessa espécie as fêmeas levem tempo até que o desenvolvimento secundário se inicie.

Para analisar esta hipótese, seria necessário acompanhar o desenvolvimento por um período mais longo, até que o desenvolvimento gonadal fosse estabelecido de forma dimórfica, assim como em adultos, e que na análise morfológica fosse encontrado oócitos em desenvolvimento secundário ou formação de alvéolos corticais. Dessa forma seria possível também analisar a proporção sexual dos indivíduos com maior confiabilidade.

Outra possível hipótese seria que, estes indivíduos poderiam estar apresentando gônadas intersexo ocasionada possivelmente pelas condições de criação dos mesmos, envolvendo fatores ambientais e físico-químicos da água (WEDEKIND, 2014; LI et al., 2019), até mesmo contaminantes endócrinos (WOODLING et al., 2006).

Alguns trabalhos abordam esse acontecimento em algumas populações, como é o caso de *Catostomus commersoni* (WOODLING et al., 2006) e *oryzias latipes* (GRIM et al., 2007), no entanto a causa do aparecimento de intersexo ainda é incerta pois muitos são os parâmetros que podem interferir. Em lambari (*Astyanax altiparanae*) foi demonstrado que a administração de doses de estradiol pode levar ao intersexo nos indivíduos, alterando também a expressão de genes como *dmrt1*, que mesmo sendo considerado um gene ligado a diferenciação testicular, apresentou expressão em fêmeas como um possível regulador de *cyp19a1a* (MARTINEZ-BENGOCHEA et al., 2020). Em *Clarias gariepinus*, tratados com metiltestosterona houve a formação de ovário e testículo na mesma gônada. Nesses indivíduos foi identificado a expressão de genes determinantes de ambos os sexos, como *sox9*, *dmrt1* e *foxl2*, isso porque esses genes estão diretamente relacionados as células germinativas (RAGHUVER & SENTHILKUMARAN, 2009). Sendo assim, se existem células dos dois sexos, a expressão desses genes vai ocorrer por conta da presença dessas células. No presente trabalho, essa possibilidade foi cogitada devido ao trabalho recém-publicado, cujo a análise do desenvolvimento sexual de piracanjuba foi realizada, e demonstra que a diferenciação gonadal de machos e fêmeas ocorreram no mesmo período e a espécie foi caracterizada como

gonocórsta diferenciado (ZARDO et al., 2021) apresentando assim resultados diferentes dos obtidos aqui.

Para que essas hipóteses sejam melhores analisadas, se faz necessário a continuação do estudo, com análises em indivíduos a partir de 12 meses de idade, até que os sexos sejam estabelecidos e a expressão dos genes ocorra como é demonstrado em adultos.

4. CONCLUSÃO

Todos os genes analisados demonstraram estar envolvidos na diferenciação sexual, no entanto, não se sabe quais deles são essenciais nesse processo. Desses genes *dmrt1*, *sox9*, *ddx20* e *foxl2* apresentaram dimorfismo sexual perceptível em eletroforese, possibilitando a identificação do sexo em adultos, sendo *dmrt1* possivelmente um gene determinante no processo de diferenciação testicular, no entanto para uma melhor análise de dados se faz necessário uma análise quantitativa (qPCR).

Nesse estudo, os indivíduos de piracanjuba apresentaram diferenciação de fêmeas aos 6 meses e o primeiro sinal de machos também aos 6 meses de idade em um indivíduo intersexo, sendo que testículos em desenvolvimento foram encontrados apenas a partir dos 10 meses de idade. Análises em períodos anteriores ao apresentado aqui devem ser feitas para confirmar se as fêmeas e machos se desenvolvem antes disso.

Até os 12 meses de idade a proporção sexual não mostrou desvio, sendo de 1:1. Além disso essa proporção não apresentou diferença entre os tratamentos de criação de larvas individualizadas e em grupo.

A identificação de sexo precoce na espécie, realizada por meio das larvas não foi possível pelo fato dos genes utilizados apresentarem expressão em variados tecidos além da gônada, e o gene *dmrt1* que não é expresso em outros tecidos, não apresenta expressão na fase larval. No entanto, através da quantificação desses genes pode ser possível identificar diferença na expressão entre os indivíduos.

Para que este estudo seja mais completo e tenha maiores detalhes sobre a expressão desses genes se faz necessário análises de qPCR, podendo utilizar os genes aqui listados como bons marcadores sexuais na espécie.

5. REFERÊNCIAS

ADOLFI, M. C. et al. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*.

Reproductive Biology and Endocrinology, v. 13, n. 2, p. 1 – 15, 2015.

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's Island Waters. **Conservation biology**, v. 19, p. 646 – 652, 2005.

AKAMA, A. et al. *Brycon orbignyanus*. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Org.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI - Peixes**. Brasília: ICMBio. p. 91-94, 2018.

ANDRADE, L. S. et al. Canibalismo entre larvas de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, cultivadas sob diferentes densidades de estocagem. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 3, p. 299-302, 2004.

ARASHIRO, D. R. et al. Synchronizing developmental stages in Neotropical catfishes for application in germ cell transplantation. **Zygote**, p. 1-14. 2018.

BABIAK, I, et al. Cryopreservation of rainbow trout blastoderm. **Cybium**, v. 32, n. 2, p. 139 – 141, 2008.

BAROILLER, J. F.; D' COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 399-409, 2001.

BARON, D. et al. An evolutionary and functional analysis of *FoxL2* in rainbow trout gonad differentiation. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 33, p. 705–715, 2004.

BERBEJILLO, J. et al. Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). **Fish Physiol Biochem**, v. 39, p. 91–94, 2013.

BI, W. et al. Sox9 is required for cartilage formation. **Nature Genetics**, v. 22, p. 85-89, 1999.

BLÁZQUEZ, M. et al. Cloning and sequence analysis of a vasa homolog in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*): tissue distribution and mrna expression levels during early development and sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 322-333, 2011.

BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of Piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture nutrition**, v. 12, p. 183 – 191, 2006.

BRAAT, A. K. et al. Characterization of Zebrafish Primordial Germ Cells: Morphology and Early Distribution of *vasa* RNA. **Developmental Dynamics**, v. 216, p. 153–167, 1999.

BROWN-PETERSON, N.J. et al. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries**, v. 3, p. 52–70, 2011.

CASTRO, J. P. et al. Differential Expression of Genes Related to Sexual Determination Can Modify the Reproductive Cycle of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) in B Chromosome Carrier Individuals. **Genes**, v. 909, p. 1-12, 2019.

CLARKSON, Y. L. et al. Extracellular Localisation of the C-Terminus of DDX4 Confirmed by Immunocytochemistry and Fluorescence-Activated Cell Sorting. **Cells**, v. 578, n. 8, p. 1-15, 2019.

CHIANG, E. F. et al. Two *Cyp19* (P450 Aromatase) Genes on Duplicated Zebrafish Chromosomes Are Expressed in Ovary or Brain. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 4, p. 542–550, 2001.

CHESHENKO, K. et al. Expression of Zebra Fish Aromatase *cyp19a* and *cyp19b* Genes in Response to the Ligands of Estrogen Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor. **Toxicological sciences**, v. 96, n. 2, p. 255–267, 2007.

CHEN, L. et al., Perfluorobutanesulfonate Exposure Skews Sex Ratio in Fish and Transgenerationally Impairs Reproduction. **Environmental Science & Technology**, v. 53, p. 8389–8397, 2019.

- CORDEIRO, J. G. et al. Reproductive cycle of the tetra *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae) collected in Amazonian streams. **Zygote**, p. 1 – 8, 2019.
- CRISPONI, L. et al. The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. **Genetics Nature**, v. 27, p. 159-166, 2001.
- DAVEY, A. J. H.; JELLYMAN, D. J. Sex Determination in Freshwater Eels and Management Options for Manipulation of Sex. **Rev Fish Biol Fisheries**, v. 15, p. 37–52, 2005.
- DONG, X. et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *Sox9a* and *Foxl2* genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Acta Oceanologica**, v. 30, n. 1, p. 68-77, 2011.
- FEIDEN, A.; HAYASHI, C. Desenvolvimento de juvenis de Piracanjuba (*Brycon orbignyannus*), Vallencienes (1849) (Teleostei: Characidae) em tanques experimentais fertilizados com adubação orgânica. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 591 – 600, 2005.
- FRANCIS, R. C.; BARLOW, G. W. Social control of primary sex differentiation in the Midas cichlid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 10673-10675, 1993.
- GOVOROUN, M. S. et al. Isolation of Chicken Homolog of the *FOXL2* Gene and Comparison of Its Expression Patterns With Those of Aromatase During Ovarian Development. **Developmental Dynamics**, v. 231, p. 859–870, 2004.
- GUIGUEN, Y. et al. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 352–366, 2010.

GUO, Y. et al. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, p. 950-957, 2005.

GRIER, H. J. and TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the common Snook. **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 521–42, 1998.

GRIM, K. C. et al. Intersex in japanese medaka (*oryzias latipes*) used as negative controls in toxicologic bioassays: a review of 54 cases from 41 studies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1636–1643, 2007.

HEALY, C. et al. Regulation and Role of Sox9 in Cartilage Formation. **Developmental Dynamics**, v. 215, p. 69–78, 1999.

HIGAKI, S. et al. Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cell by whole embryo freezing. **Japanese Journal of veterinary research**, v. 52, n. 2, p. 119 – 128, 2009.

HINFRAY, N. et al. Dynamic and differential expression of the gonadal aromatase during the process of sexual differentiation in a novel transgenic *cyp19a1a*-eGFP zebrafish line. **General and Comparative Endocrinology**, v. 261, p. 179-189, 2018.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 143–150, 1999.

HUANG, B. et al. Autosomal XX Sex Reversal Caused by Duplication of SOX9. **American Journal of Medical Genetics**, v. 87, p. 349–353, 1999.

INOUE, D. et al. Vitriification of primordial germ cells using whole embryos for gene-banking in loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, p. 919–924, 2012.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI - Peixes**. In: Instituto Chico Mendes

de Conservação da Biodiversidade (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília. 1232p. 2018.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Peixes - *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) – Piracanjuba**. 2014. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira?id=6219:especie-6219>. Acesso em: 29/06/2021.

JORGENSEN, A. et al. Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, n. 25, p. 1-12, 2008.

KNAUT, H. et al. Zebrafish *vasa* RNA but Not Its Protein Is a Component of the Germ Plasm and Segregates Asymmetrically before Germline Specification. **The Journal of Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 875–888, 2000.

KENT, J. et al. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. **Development**, v. 122, p. 2813-2822, 1996.

KETTLEWELL, J. R. et al. Temperature-Dependent Expression of Turtle *Dmrt1* Prior to Sexual Differentiation. **Genesis**, v. 26, p. 174–178, 2000.

KOBAYASHI, T. et al. Two DM Domain Genes, *DMY* and *DMRT1*, Involved in Testicular Differentiation and Development in the Medaka, *Oryzias latipes*. **Developmental Dynamics**, v. 231, p. 518–526, 2004.

KOBAYASHI, Y.; NAGAHAMA, Y.; NAKAMURA, M. Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. **Sexual Development**, v. 7, p. 115–125, 2012.

KROVEL, A. V.; OLSEN, L. C. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish *vasa* during gonadal development. **Developmental Biology**, v. 271, p. 190–197, 2004.

LEE, K. et al. Transcriptional factor FOXL2 interacts with DP103 and induces apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, p. 876–881, 2005.

LI, M. et al. Roles of estrogens in fish sexual plasticity and sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 277, p. 9-16, 2019.

LI, M. et al. Medaka *vasa* is required for migration but not survival of primordial germ cells. **Mechanisms Of Development**, v. 126, p. 366 –381, 2009.

LI, Q. et al. FOXL2 down-regulates vitellogenin expression at mature stage in *Eriocheir sinensis*. **Biochemical Society**, v. 35, p. 1-17, 2015.

LIARTE, S. et al. Testicular involution prior to sex change in gilthead seabream is characterized by a decrease in DMRT1 gene expression and by massive leukocyte infiltration. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 20, n. 15, p. 1-15, 2007.

LIU, Z. et al. Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. **Journal of Endocrinology**, v. 194, p. 223–241, 2007.

LOFFLER, K. A. et al. Etiology of Ovarian Failure in Blepharophimosis Ptois Epicanthus Inversus Syndrome: FOXL2 Is a Conserved, Early-Acting Gene in Vertebrate Ovarian Development. **The Endocrine Society**, v. 144, n. 7, p. 3237–3243, 2003.

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciência e Investigação Agrária**, v. 36, n.2, p.191-208, 2009.

LUZ, R. K. Avaliação de canibalismo e comportamento territorial de alevinos de trairão (*Hoplias lacerdae*). **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 465-469, 2000.

MANOLAKOU, P.; LAVRANOS, G.; ANGELOPOULOU, R. Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 59, n. 4, p. 1-23, 2006.

MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, p. 298 – 306, 2006.

MARTINEZ-BENGOCHEA, A. et al. Effects of 17 β -estradiol on early gonadal development and expression of genes implicated in sexual differentiation of a South American teleost, *Astyanax altiparanae*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 248–249, 2020.

MATSON, C. K. et al. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. **Nature**, v. 476, p. 101–104, 2011.

MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTO, I. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). **The Anatomical Record**, v. 293, p. 1581–1606, 2010.

MELO, N. et al. Performance and food behaviour of *Brycon orbignyanus* larvae submitted under food restriction. **Aquaculture**, p.1–8, 2020.

MOUILLET, J. F. et al. DEAD-Box Protein-103 (DP103, Ddx20) Is Essential for Early Embryonic Development and Modulates Ovarian Morphology and Function. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2168–2175, 2008.

NAKAMOTO, M. et al. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, p. 353–361, 2006.

OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L. F. A. Evidence of an XX/XY sex chromosome system in the fish *Dormitator maculatus* (Teleostei, Eleotrididae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 653–655, 2006.

OTTOLENGHI, C. et al. *Foxl2* is required for commitment to ovary differentiation. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 14, p. 2053–2062, 2005.

PANNETIER, M. et al. FOXL2 activates *P450 aromatase* gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, p. 399–413, 2006.

RAGHUVeer, K.; SENTHILKUMARAN, B. Identification of multiple *dmrt1s* in catfish: localization, dimorphic expression pattern, changes during testicular cycle and after methyltestosterone treatment. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 42, p. 437– 448, 2009.

RAYMOND, C. S. et al. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. **Genes & Development**, v. 14, p. 2587–2595, 2000.

RAYMOND, C. S. et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. **Nature**, v. 391, p. 691-695, 1998.

RAZ, E. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biology*, v. 1, n. 3, P. 1–1017, 2000.

RODRÍGUEZ-MARI, A. et al. Characterization and expression pattern of zebrafish *anti-Mullerian* hormone (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. **Gene Expression Patterns**, v. 5, p. 655–667, 2005.

RODRÍGUEZ-MARI, A. et al. Sex Reversal in Zebrafish *fanc1* Mutants Is Caused by Tp53-Mediated Germ Cell Apoptosis. **PLoS Genetics**, v. 6, p. 1-14, 2010.

ROMANO, S. et al. Loss of *dmrt1* restores female fates in the absence of *cyp19a1a* but not *rbpms2a/b*. **Development**, v. 147, 2020.

RONCARATI, A. et al. Influence of stocking density of European eel (*Anguilla anguilla*, L.) elvers on sex differentiation and zootechnical performances. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 13, p. 131-136, 1997.

SANTOS, R. S. et al. Embryonic development of the fire-eye-tetra *Moenkhausia oligolepis* (Characiformes: Characidae). **Zygote**, p. 1-5, 2021.

SARIDA, M. et al. Spatiotemporal Correlations between *amh* and *cyp19a1a* Transcript Expression and Apoptosis during Gonadal Sex Differentiation of Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. **Sexual Development**, v. 13, p. 99 – 108, 2019.

SCHMIDT, D. et al. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. **Development and disease**, v. 131, p. 933-942, 2004.

SCHUDROWITZ, N. et al. Germline factor DDX4 functions in blood-derived cancer cell phenotypes. **Cancer Science**, v. 108, p. 1612–1619, 2017.

SHAN, B. et al. Comparative transcriptomic analysis for identification of candidate sex-related genes and pathways in Crimson seabream (*Parargyrops edita*). **Nature**, v. 11, n. 1077, p. 1-12, 2021.

SHANG, E. H. H.; YU, R. M. K.; WU, R. S. S. Hypoxia Affects Sex Differentiation and Development, Leading to a Male-Dominated Population in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 3118-3122, 2006.

SIMPSON, E. R. Tissue-specific Promoters Regulate Aromatase Cytochrome P450 Expression. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, n. 4-6, p. 321-330, 1993.

SMITH, C. A. et al. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. **Nature**, v. 461, p. 267-271, 2009.

STRUSSMANN, et al. Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey*. **Journal of Fish Biology**, v. 48, p. 643–651, 1996.

TAKAMATSU, N. et al. Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression Nobuhiko. **Gene**, v. 202, p. 167–170, 1997.

TONELLA, L. H. et al. Conservation status and bio-ecology of *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Bryconidae), an endemic fish species from the Paraná River basin (Brazil) threatened with extinction. **Neotropical Ichthyology**, v.7, n. 3, 2019.

TIAN, C. et al. DExD/H-box RNA helicase genes are differentially expressed between males and females during the critical period of male sex differentiation in channel catfish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 22, p. 109–119, 2017.

USHIDA, D. et al. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137, p. 11–20, 2004.

VILELA, C.; HAYASHI, C. Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 11758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 491 – 496, 2001.

YAN, T. et al. Characterization and expression profiles of *cyp19a1a* in the schizothoracine fish *Schizothorax prenanti*. **Tissue and Cell**, v. 58, p. 70–75, 2019.

YASUI, G. S. et al. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. **Journal of animal Science**, v. 89, n. 8, p. 2380-2388, 2011.

YOKOI, H. et al. *sox9* in a Teleost Fish, Medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for Diversified Function of Sox9 in Gonad Differentiation. **Molecular Reproduction And Development**, v. 63, p. 5–16, 2002.

YOON, C.; KAWAKAMI, K.; HOPKINS, N. Zebrafish vasahomologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. **Development**, v. 124, p. 3157-3166, 1997.

WAGNER, T. et al. Autosomal Sex Reversal and Campomelic Dysplasia Are Caused by Mutations in and around the SRY-Related Gene SOX9. **Cell**, v. 79, 1111-1120, 1994.

- WANG, D. et al. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 83–89, 2004.
- WANG, D. 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. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 3, p. 712–725, 2007.
- WEDEKIND, C. Fish populations surviving estrogen pollution. **BMC Biology**, v. 12, n. 10, p. 1-3, 2014.
- WOODLING, J. D. et al. Intersex and other reproductive disruption of fish in wastewater effluent dominated Colorado streams. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 10–15, 2006.
- WU, G. C. et al. Dual Roles of *cyp19a1a* in Gonadal Sex Differentiation and Development in the Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 1111–1120, 2008.
- XIN, M. et al. Molecular and subcellular cryoinjury of fish spermatozoa and approaches to improve cryopreservation. **Aquaculture**, v. 12, p. 1-16, 2019.
- ZARDO, E. L. et al. Gonadal development period and sexual differentiation through histological analysis in *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Bryconidae). **Aquaculture**, v. 539, 2021
- ZHANG, Y. et al. Expression profiles of amhy and major sex-related genes during gonadal sex differentiation and their relation with genotypic and temperature- dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **General and Comparative Endocrinology**, 2018.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Adendo I. Gel em eletroforese referente ao genes *b-actina*, *dmrt1*, *cyp19a1*, *sox9*, *ddx20*, *ddx4* e *foxl2* em juvenis de sete à doze meses de idade.

