

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 31/08/2022.



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



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

**Juliana Morena Bonita Ricci**

Botucatu, São Paulo  
2020



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



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

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

**Juliana Morena Bonita Ricci**

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

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

**Botucatu, São Paulo**  
**2020**

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ricci, Juliana Morena Bonita.

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

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Rafael Henrique Nóbrega  
Coorientador: Eduardo Antônio Sanches  
Capes: 20200005

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

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

## **Dedicatória**

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

## Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A Francisca Maria Grandchamp, uma pessoa muito especial.

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

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

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

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ARC** - Núcleo arqueado

**AVPV** - Núcleo paraventricular anteroventral

**cDNA** - DNA complementar

**dNTP** - Deseoxirribonucleotídeos

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

**Fsh** - Hormônio folículo-estimulante

**GDEs** – Genes diferencialmente expressos

**GnRH** - Hormônio liberador de gonadotropinas

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

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

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

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

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

**kiss1R** - Receptor de kisspeptina

**LH** - Hormônio luteinizante

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

**POA** - Área pré-óptica

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

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

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

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

**pbs** - pares de base

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

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

## RESUMO

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

## ABSTRACT

The common snook (*Centropomus undecimalis*) is a protandric hermaphrodite fish of high economic importance. One of the main bottlenecks in the production of common snook consists in obtaining the captive females. As an alternative, wild females are captured or sex reversed by using sex steroids. However, little is known about the genetic information related to reproduction and sex differentiation in this species. Based on this scenario, this thesis aims to unravel the effects of sex steroids on the reproductive axis during gonadal differentiation. For this, we analyzed the expression of brain kisspeptin, gonadal morphology, and transcriptomic profiles (RNA-seq) of gonads after steroid treatment. For this purpose, 450 undifferentiated animals were divided into 3 groups which received a basal diet (control), supplemented with 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) or supplemented with 17 $\beta$ -estradiol (E2) for 45 days. The encephalon and gonads were collected immediately after hormonal treatment and at 4-month intervals during 1 year. The results revealed that MT and E2 increased brain *kiss1* mRNA levels compared to control. *kiss2* receptor transcripts did not vary between treatments. As regards to the morphology, the group treated with MT showed an advanced gonadal development with morphological features of a testis. The group that received E2 also had more developed gonads, but with morphological characteristics of the ovary. RNA-seq analysis was performed using de novo transcriptome of *C. undecimalis*. The assembly of the transcriptome generated 45,579 transcripts with a complete ratio of 85.6% and a mapping rate of 67%. Differentially expressed genes (DEGs) were identified between treatments, some related to sex differentiation, including the pro-testis genes (*nr5a2*, *tbx1*, *dmrt3*, *ptch3*, *ptch2*, *shh*, etc.) in the MT group and the E2 group the pro-ovarian DEGs (*cyp19a1*, *foxl2*, *irx5*, *wnt4a*, *rspo1*, *fst*, etc). Our results suggested that *kiss1* neurons are sensitive to the action of sex steroids. Treatment with MT stimulated testicular development, on the other hand, E2 seems to have reversed the fate of sex differentiation of the gonads, resulting in an ovary at the beginning of development. Finally, de novo gonadal transcriptome in the thesis has resulted in a valuable genomic resource for screening potential pathways and genes involved in the sexual differentiation of *C. undecimalis*.

## SUMÁRIO

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

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

## 1. INTRODUÇÃO

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

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

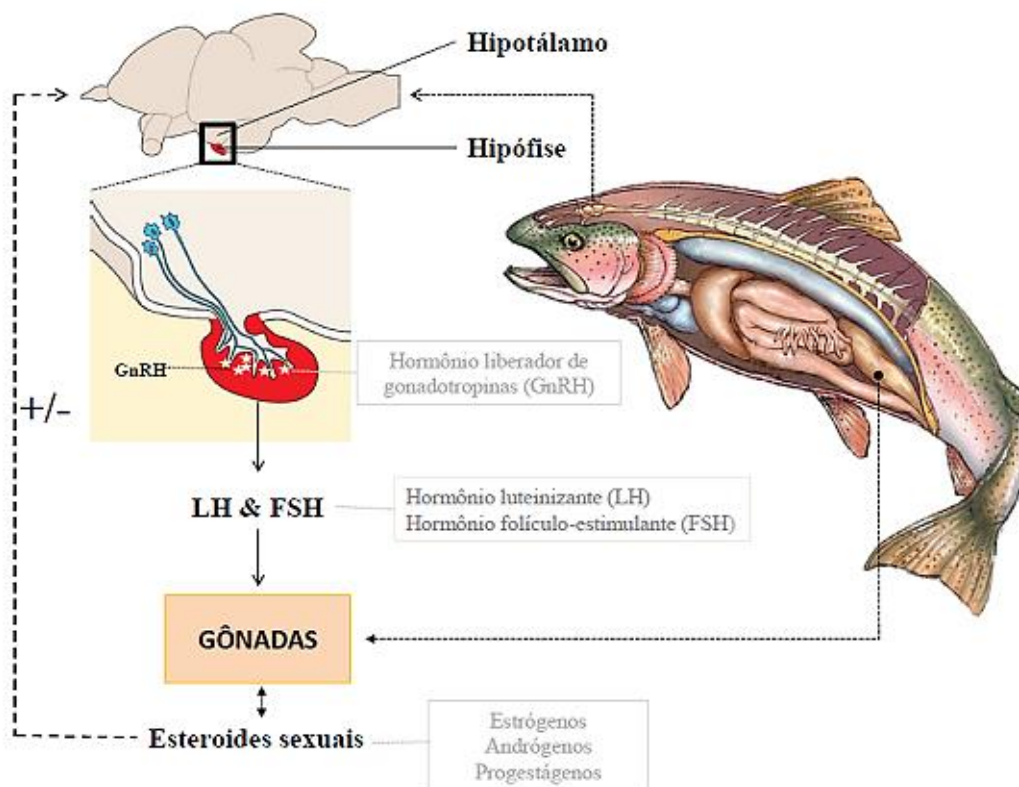
NAKAMURA, 2013; SCHARTL, 2004), e/ou (2) ambiental, fatores abióticos (temperatura da água, pH) ou bióticos (densidade populacional) podem determinar/diferenciar o sexo (BAROILLER; D'COTTA; SAILLANT, 2009).

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

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

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

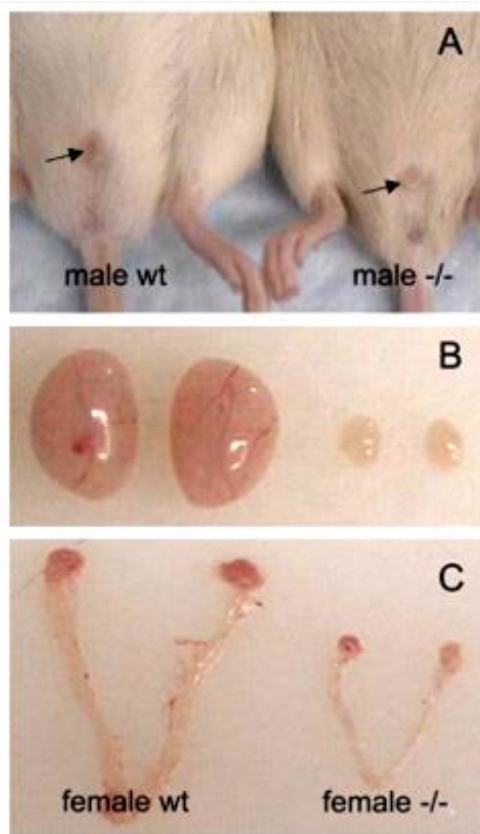
conectam diretamente à glândula hipófise. Na hipófise, o GnRH estimula as células gonadotrópicas, células produtoras do hormônio folículo estimulante (Fsh) e hormônio luteinizante (Lh), na síntese e secreção das gonadotropinas (Fsh e Lh) (ZOHAR *et al.*, 2010). As gonadotropinas através da corrente sanguínea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



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

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

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



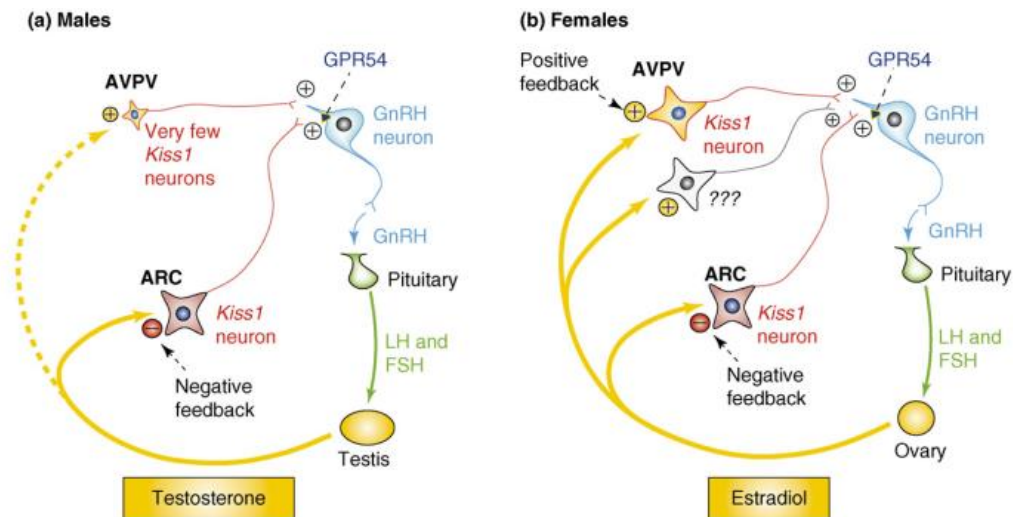
**Figura 2.** Análise macroscópica de ratos machos e fêmeas selvagens e GPR54<sup>-/-</sup>, com 30 dias de idade. (A) Visualização externa de macho selvagem e GPR54<sup>-/-</sup>, mostrando pênis de tamanho reduzido. (B) Testículo reduzido de macho GPR54<sup>-/-</sup> comparado ao macho selvagem. (C)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

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

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

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

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



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

### 1.1. Kisspeptinas nos teleósteos

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

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

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

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

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

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

### 1.2. Diferenciação sexual

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

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

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

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

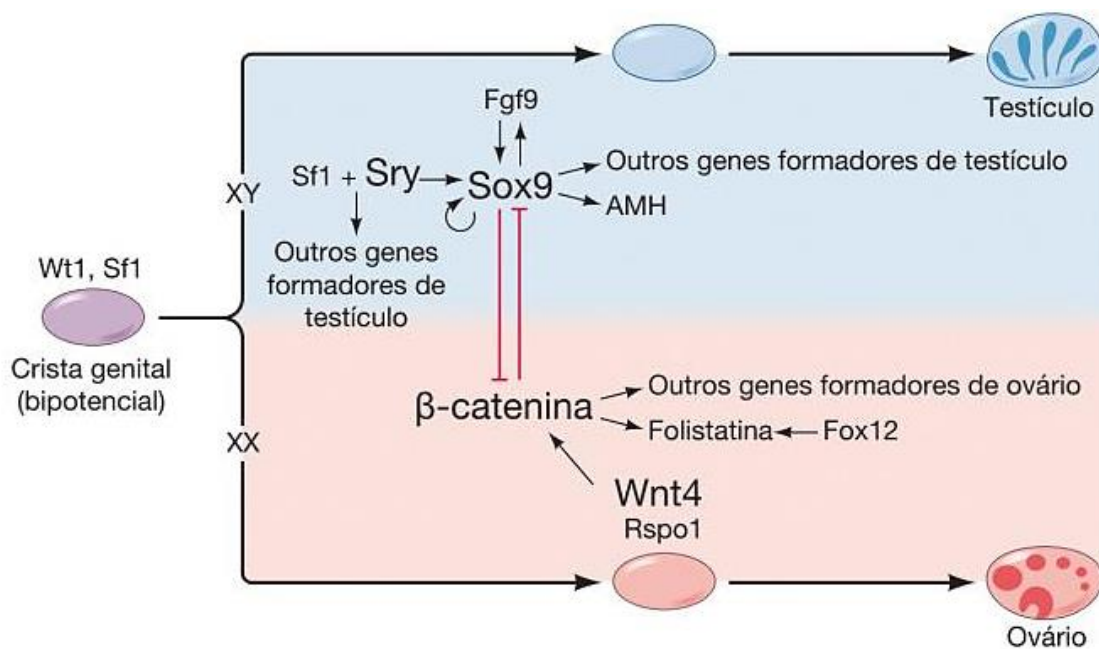
Assim como nos mamíferos, a via do ácido retinoico mostrou-se importante para a espécie de peixe *Siluris meridionalis* (LI; FENG; MA; DONG *et al.*, 2016) porém, para medaka e tilápia apesar da via ser importante na indução da meiose, não houve relação com a entrada da primeira meiose nas fêmeas (ADOLFI;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

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

### 1.3. Diferenciação masculina

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

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



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

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

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

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

#### 1.4. Diferenciação ovariana

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

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

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

## 7. CONCLUSÃO

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

## 8. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- PHUC THUONG, N.; SUNG, Y. Y.; AMBAK, M. A.; ABOL-MUNAFI, A. B. The hormone 17 $\beta$ -estradiol promotes feminization of juveniles protandrous hermaphrodite false clownfish (*Amphiprion ocellaris*). **Mar Freshw Behav Phy**, 50, n. 3, p. 195-204, May 2017.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, 197, n. 1, p. 229-281, Jun 2001.
- PITETTI, J. L.; CALVEL, P.; ROMERO, Y.; CONNE, B. *et al.* Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice. **PLoS Genet**, 9, n. 1, p. e1003160, 2013.
- SARTER, K.; PAPADAKI, M.; ZANUY, S.; MYLONAS, C. C. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 $\alpha$ -methyltestosterone implants. **Aquaculture**, 256, n. 1, p. 443-456, Jun 2006.
- SCHARTL, M. A comparative view on sex determination in medaka. **Mech Dev**, 121, n. 7-8, p. 639-645, Jul 2004.
- SEKIDO, R.; BAR, I.; NARVÁEZ, V.; PENNY, G. *et al.* SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. **Dev Biol**, 274, n. 2, p. 271-279, Oct 2004.
- SEKIDO, R.; LOVELL-BADGE, R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. **Nature**, 453, n. 7197, p. 930-934, Jun 2008.
- SELVARAJ, S.; OHGA, H.; KITANO, H.; NYUJI, M. *et al.* Peripheral administration of Kiss1 pentadecapeptide induces gonadal development in sexually immature adult scombroid fish. **Zoolog Sci**, 30, n. 6, p. 446-454, Jun 2013.
- SELVARAJ, S.; OHGA, H.; NYUJI, M.; KITANO, H. *et al.* Subcutaneous administration of Kiss1 pentadecapeptide accelerates spermatogenesis in prepubertal male chub mackerel (*Scomber japonicus*). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 166, n. 2, p. 228-236, Oct 2013.
- SEMINARA, S. B.; MESSENGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R. *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. **N Engl J Med**, 349, n. 17, p. 1614-1627, Oct 2003.
- SERVILI, A.; LE PAGE, Y.; LEPRINCE, J.; CARATY, A. *et al.* Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. **Endocrinology**, 152, n. 4, p. 1527-1540, Apr 2011.
- SHI, Y.; ZHANG, Y.; LI, S.; LIU, Q. *et al.* Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17 $\alpha$ -methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. **Biol Reprod**, 83, n. 1, p. 63-74, Jul 2010.
- SHIBATA, M.; FRIEDMAN, R. L.; RAMASWAMY, S.; PLANT, T. M. Evidence that down regulation of hypothalamic KiSS-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **J Neuroendocrinol**, 19, n. 6, p. 432-438, Jun 2007.
- SIMPSON, E. R.; MAHENDROO, M. S.; MEANS, G. D.; KILGORE, M. W. *et al.* Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocr Rev**, 15, n. 3, p. 342-355, Jun 1994.

- SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V. *et al.* BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, 31, n. 19, p. 3210-3212, Oct 2015.
- SINCLAIR, A.; SMITH, C. Females battle to suppress their inner male. **Cell**, 139, n. 6, p. 1051-1053, Dec 2009.
- SINGH, A. K. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. **Gen Comp Endocrinol**, 181, p. 146-155, Jan 2013.
- SMITH, C. A.; ROESZLER, K. N.; OHNESORG, T.; CUMMINS, D. M. *et al.* The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. **Nature**, 461, n. 7261, p. 267-271, Sep 2009.
- SMITH, E. K.; GUZMÁN, J. M.; LUCKENBACH, J. A. Molecular cloning, characterization, and sexually dimorphic expression of five major sex differentiation-related genes in a Scorpaeniform fish, sablefish (*Anoplopoma fimbria*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 165, n. 2, p. 125-137, Jun 2013.
- SMITH, J. T-box genes: what they do and how they do it. **Trends Genet**, 15, n. 4, p. 154-158, Apr 1999.
- SMITH, J. T.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. **Reproduction**, 131, n. 4, p. 623-630, Apr 2006.
- SMITH, J. T.; CUNNINGHAM, M. J.; RISSMAN, E. F.; CLIFTON, D. K. *et al.* Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, 146, n. 9, p. 3686-3692, Sep 2005.
- SMITH, J. T.; DUNGAN, H. M.; STOLL, E. A.; GOTTSCH, M. L. *et al.* Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. **Endocrinology**, 146, n. 7, p. 2976-2984, Jul 2005.
- SMITH, J. T.; LI, Q.; PEREIRA, A.; CLARKE, I. J. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, 150, n. 12, p. 5530-5538, Dec 2009.
- SPEED, R. M. Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. **Chromosoma**, 85, n. 3, p. 427-437, 1982.
- SRIDEVI, P.; SENTHILKUMARAN, B. Cloning and differential expression of FOXL2 during ovarian development and recrudescence of the catfish, *Clarias gariepinus*. **Gen Comp Endocrinol**, 174, n. 3, p. 259-268, Dec 2011.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, 30, n. 9, p. 1312-1313, May 2014.
- TAJIMA, Y.; WATANABE, D.; KOSHIMIZU, U.; MATSUZAWA, T. *et al.* Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-alpha stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes. **Int J Androl**, 18, n. 1, p. 8-12, Feb 1995.
- TARANGER, G. L.; CARRILLO, M.; SCHULZ, R. W.; FONTAINE, P. *et al.* Control of puberty in farmed fish. **Gen Comp Endocrinol**, 165, n. 3, p. 483-515, Feb 2010.

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

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

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

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