

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/04/2024.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**EFEITOS DA AÇÃO DE COMPOSTOS  
NATURAIS NA INVERSÃO SEXUAL DE  
*Danio rerio* DURANTE SUA  
DIFERENCIAÇÃO GONADAL**

**Graziele Cristine da Silva**

**Jaboticabal – São Paulo**

**2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**EFEITOS DA AÇÃO DE COMPOSTOS  
NATURAIS NA INVERSÃO SEXUAL DE**  
*Danio rerio* **DURANTE SUA**  
**DIFERENCIAÇÃO GONADAL**

**Graziele Cristine da Silva**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Talita Sarah Mazzoni**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Jaboticabal – São Paulo**

**2022**

S586e	Silva, Grazielle Cristine da Efeitos da ação de compostos naturais na inversão sexual Danio rerio durante sua diferenciação gonadal / Grazielle Cristine da Silva. -- Jaboticabal, 2022 65 p. : tabs., fotos  Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Talita Sarah Mazzoni  1. Hermafroditismo. 2. Metaloproteinases da Matriz. 3. Zebrafish. 4. Morfogênese. I. Título.
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

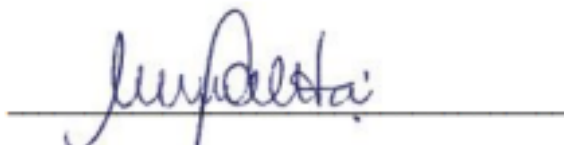
## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** EFEITOS DA AÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NA INVERSÃO SEXUAL DE *Danio rerio* DURANTE SUA DIFERENCIAÇÃO GONADAL

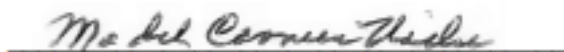
**AUTORA:** GRAZIELE CRISTINE DA SILVA

**ORIENTADORA:** TALITA SARAH MAZZONI

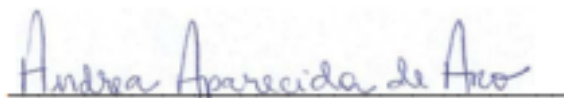
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Talita Sarah Mazzoni (Participação Virtual)  
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG



Profa. Dra. Mari Carmen Uribe Aranzabal (Participação Virtual)  
Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México



Profa. Dra. Andrea Aparecida de Aro (Participação Virtual)  
Sociedade Beneficente Israelita Albert Einstein – São Paulo

Jaboticabal, 28 de abril de 2022

## DEDICATÓRIAS

*Aos meus pais, Amarildo Candido e Luzia Aparecida*

Não tenho palavras suficientes para expressar a minha gratidão pelo amor incondicional, carinho e dedicação que sempre me deram. Vocês se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional, e principalmente pessoal. Eu devo tudo que sou a vocês, e se sinto orgulho de mim e do lugar onde cheguei, é porque sei que vocês vieram segurando a minha mão em cada passo dado. Agradeço pela vida que me deram, e por serem os melhores pais do mundo. Eu dedico este título à vocês. Obrigada meu pai e minha mãe! Eu amo vocês!

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um facto inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”

**- Bertrand Russell**

*Às minhas irmãs, Gislayne Figueiredo e Gisely Figueiredo*

Ser irmã caçula é conhecer a proteção e amor que jamais poderá ser explicado. A distância sempre foi um obstáculo em nossa caminhada, mas nunca impediu que pudéssemos estar conectadas. Muitas vezes posso ser teimosa e mimada, brigar e discutir, mas o sangue que nos une é tão real como a amizade que nos aproxima. Tive a sorte de ganhar duas amigas, ao mesmo tempo que ganhei duas irmãs, e disso jamais abrirei mão. As palavras são poucas para agradecer por tudo o que vocês tem feito em minha vida, por todos os conselhos, abraços e carinhos, por todas as palavras de consolo, pelas vezes que você me fizeram sorrir, me defenderam, me protegeram e não desistiram de mim. Depois de muitas despedidas, choros, horas de viagem e tristeza, hoje poderemos comemorar mais uma conquista que sem vocês não possível.

Que o Senhor nos conceda muitos anos de fraternidade, e que todos os dias abençoe-nos com muita saúde e felicidade. Obrigada por serem meu porto seguro! Amo vocês.

“Vocês podem ser tão diferentes como o sol e a lua, mas o mesmo sangue flui através do coração de ambas. Você precisa dela assim como ela precisa de você!”  
- **George R. R. Martin**

*À Professora Talita Sarah Mazzoni*

Seis anos se passaram e aqui estamos nós diante de mais uma conquista. Em diversas vezes me pego pensando o que passei em minha trajetória até aqui e fico sem acreditar que tudo isso foi possível. Você é um exemplo de profissional e se eu cheguei até aqui é simplesmente por você ser quem você é! Não é a toa que os alunos e companheiros de profissão te admiram. Foram muitas lágrimas, muito estresse, muitas viagens, muitas aulas, muitas noites em claro, mas também muitas risadas.

Desde o início eu sempre vi você incentivar e apoiar todos os seus alunos, os merecedores e os menos merecedores. Muitos tiveram a oportunidade de trabalhar com você, mas não tiveram a sorte de compreender o quanto aquilo seria enriquecedor, profissionalmente e pessoalmente. A cada dia você consegue me surpreender ainda mais com o tamanho do seu coração (mas por favor, pare de oferecer carona para desconhecidos).

O tempo nos trouxe não só o companheirismo, mas a amizade também. E quando abrimos mão de nossa cidade de origem para estudar, é preciso construir ligações com pessoas que possam segurar nossa mão em dias difíceis e nublados. E você foi essa pessoa. Jamais se esqueça que você é uma pessoa muito especial e pessoas especiais brilham em nossas vidas como estrelas no céu.

Obrigada professora amiga Talita por toda paciência e dedicação que você teve comigo. Espero que em um futuro próximo mais conquistas possam vir.

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais...”

**- Rubem Alves**

“Todo profissional é prosa. Só o professor é poesia.”

**- Leonardo L. Bcena**



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Deus por todas as coisas boas e ruins que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou. Foi uma longa jornada de tropeços, vitórias e derrotas, que me fez enxergar o verdadeiro significado e beleza da vida.

Hoje sou uma pessoa melhor, mais compreensiva e forte graças aos seus ensinamentos. Hoje tenho maturidade para me reconciliar com os meus erros e defeitos, e discernimento para entender as linhas que o Senhor traçou para a minha vida. Peço que continue a me abençoar e a me proteger com as tuas mãos poderosas, e agradeço por confiar a mim o dom da vida e me comprometo a buscar a paz, a bondade e a felicidade!

Em segundo lugar gostar de agradecer à todas as pessoas que direta e indiretamente me ajudaram e estavam presentes ao longo de minha jornada:

- Às minhas amigas Ana Laura e Isabela Dias, pela amizade sincera, por me incentivarem e por nunca soltarem a minha mão, mesmo estando longe. Obrigada por estarem comigo e saibam que estarei sempre com vocês em todos os momentos;

- À meu amigo Gustavo Junqueira, que desde 2014 sempre me abraçou com palavras, esteve ao meu lado e me fez ter confiança nas minhas decisões mesmo estando longe;

- Às amigas da pós-graduação, Carol Giroto Presseti e Júlia L. Moreira Nacif, pelo companheirismo e amizade que construímos em meio ao caos, e que em muitas noites foram confidentes se mostrando amigas especiais mesmo nos momentos difíceis;

- Ao meus colegas pertencentes ao grupo de pesquisa Biologia da Reprodução de Peixes e Organismos Aquáticos - BIOREPOAQUA, pela oportunidade do convívio e pela cooperação mútua durante estes anos, no qual foi possível a realização deste e de muitos outros projetos;

- À Professora Irani Quagio-Grassiotto, por me receber e permitir que eu pudesse participar das pesquisas em andamento no seu laboratório. Obrigada por todo o apoio oferecido indiretamente e saiba que sou eternamente grata por todo o seu suporte;
- Ao Professor Rafael Henrique Nóbrega, da Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita – UNESP, que como parceiro científico de longa data de minha orientadora, inicialmente aceitou me orientar neste programa;
- Ao Laboratório de Biologia Animal Integrativa – LABAInt, e a técnica Juliana Ramos Martins, pela colaboração e pelas aulas sobre como cuidar dos equipamentos, fazer reagentes e experimentos, no qual foram ensinamentos extremamente valiosos;
- Às professoras Dr<sup>a</sup>. Marisa Ionta e Dr<sup>a</sup> Márcia C. Bizinotto de Assunção do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG, que sempre estavam dispostas a me ajudar e aconselhar ao longo da pesquisa. As suas valiosas indicações, pessoais e profissionais fizeram toda a diferença em minha trajetória;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura – CAUNESP, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, possibilitando a realização desse trabalho.

## **APOIO FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Bolsa de Mestrado, Processo nº 88887.486423/2020-00 e auxílio da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Nº de Processo 15/16358-7.

## RESUMO

Os Teleostei apresentam grande plasticidade frente à expressão sexual e em muitas espécies a condição de hermafroditismo é frequente. Durante a diferenciação gonadal, a gônada sofre uma série de alterações em seu epitélio germinativo. Entretanto, até o presente momento, há poucas informações sobre as alterações que podem ocorrer também no compartimento intersticial. Frente à ausência de informações sobre o papel desempenhado pelas metaloproteinases (MMPs) na remodelação gonadal dos peixes, o presente trabalho avaliou a ação das MMPs durante a diferenciação gonadal de *Danio rerio* (zebrafish), bem como o uso de compostos naturais (*Camellia sinensis* e *Bauhinia* sp.) como possíveis inibidores das MMPs. Durante o hermafroditismo juvenil de zebrafish, observou-se uma intensa remodelação da matriz extracelular na inversão sexual dos juvenis e 3 tipos de MMPs foram detectadas: MMP-9 (em cistos germinativos), MMP-2 (em células em apoptose) e MMP-14 (em poucas células germinativas e células somáticas ao redor dos cistos). Concomitantemente, a membrana basal nos tecidos supostamente masculinos estava ausente. Juvenis expostos a altas doses de *Camellia* e *Bauhinia* apresentaram uma diminuição significativa de MMPs, levando à uma desorganização tecidual da gônada e inibição da remodelação gonadal. Como consequência, o tecido gonadal feminino foi detectado em um maior número de indivíduos nos grupos experimentais, aumentando significativamente a porcentagem de fêmeas de cada grupo. Os compostos naturais possivelmente atuaram como inibidores de MMPs e influenciaram de forma efetiva e duradoura a determinação fenotípica do sexo de *Danio rerio*. Uma vez que a inversão sexual foi definitiva, estudos com compostos naturais podem ser promissores para o desenvolvimento de novas técnicas visando o controle reprodutivo e obtenção de monossexos nas pisciculturas.

**Palavras-chave:** hermafroditismo, inversão sexual, inibidores de metaloproteinases, zebrafish, morfogênese gonadal.

## ABSTRACT

Teleostei show great plasticity in terms of sexual expression and in many species the condition of hermaphroditism is frequent. During gonadal differentiation, the gonad undergoes a series of changes in its germinal epithelium. However, until this moment, there is little information on the changes that may also occur in the interstitial compartment. In view of the lack of information on the role played by the metalloproteinases (MMPs) in fish gonadal remodeling, the present study evaluated the action of MMPs during the gonadal differentiation of *Danio rerio* (zebrafish), as well as the use of natural compounds (*Camellia sinensis* and *Bauhinia* sp.) as possible inhibitors of MMPs. During the juvenile hermaphroditism of zebrafish, an intense remodeling of the extracellular matrix was observed in the sexual inversion of juveniles and 3 types of MMPs were detected: MMP-9 (in germline cysts), MMP-2 (in apoptotic cells) and MMP-14 (in a few germ and somatic cells around the cysts). Concomitantly, the basement membrane in the supposedly male tissues was absent. Juveniles exposed to high doses of *Camellia* and *Bauhinia* showed a significant decrease in MMPs, leading to gonad tissue disorganization and inhibition of gonadal remodeling. As a consequence, female gonadal tissue was detected in a greater number of individuals in the experimental groups, significantly increasing the percentage of females in each group. The natural compounds possibly acted as inhibitors of MMPs and effectively and lastingly influenced the phenotypic sex determination of *Danio rerio*. Once the sex inversion was definitive, studies with natural compounds may be promising for the development of new techniques aiming at reproductive control and obtaining monosex in fish farms.

**Keywords:** hermaphroditism, sex inversion, metalloproteinase inhibitors, zebrafish, gonadal morphogenesis.

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes Teleostei apresentam grande plasticidade frente à expressão sexual e estratégias reprodutivas (Nagahama, 1983; Vazzoler, 1996; Nakatani et al., 2001) e ainda que a maioria das espécies seja predominantemente dioica ou gonocórica (Nagahama, 1983), algumas famílias de diferentes ordens apresentam a condição de hermafroditismo (Hoar, 1969; Le Gac e Loir, 1999; Lo Nostro, 2000; De Mitcheson e Liu, 2008).

Em algumas espécies, esse tipo de hermafroditismo pode se dar apenas durante a diferenciação gonadal do espécime, sendo classificado como hermafroditismo juvenil (Takahashi, 1977). O Cypriniformes *Danio rerio* é bastante conhecido por apresentar este tipo de diferenciação gonadal (Takahashi, 1977), na qual todos os indivíduos, independente do sexo genotípico, diferenciam-se como fêmeas e, posteriormente, antes do término do processo de estabelecimento da gônada, metade da população sofre uma inversão sexual e se tornam machos (Uchida et al., 2002).

Essa inversão do tecido gonadal nos peixes, seja em animais em diferenciação (Mazzoni et al., 2015) ou mesmo durante ciclos sexuais de adultos (Mazzoni et al., 2018), demanda a ação de diversas moléculas e processos biológicos. Sabe-se que as metaloproteinases de matriz (MMPs) estão envolvidas durante essa remodelação do tecido gonadal ao longo do ciclo reprodutivo, tanto em animais dioicos (Santana e Quagio-Grassiotto, 2014), quanto em hermafroditas (Mazzoni et al., 2018).

As MMPs, enzimas sintetizadas por vários tipos celulares e bastante conhecidas nos mamíferos, promovem a degradação da matriz extracelular e estão envolvidas em diversos processos biológicos como o desenvolvimento embrionário, implantação do blastocisto, morfogênese dos órgãos, desenvolvimento dos sistemas, ovulação, remodelação teciduais, entre outros (Lu et al., 2011 para revisão). A atividade das MMPs é regulada endogenamente pela presença de inibidores teciduais, conhecidos como TIMPs (Tissue Inhibitors of Metaloproteinases) que mantêm o equilíbrio entre a degradação e a síntese do tecido conjuntivo, controlando assim a integridade da matriz extracelular (Khokha et al., 2013). Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são expressos por uma variedade de tipos celulares e estão presentes na maioria dos tecidos e fluidos corporais (Brew et al., 2000; Lambert et al., 2004; Visse e

Nagase, 2003).

Muitas espécies de vegetais possuem substâncias, como compostos fenólicos (Croft, 1998), com a capacidade de mimetizar os TIMPs e consequentemente influenciar uma série de atividades biológicas (Schmitz et al., 2005). Os compostos fenólicos englobam uma gama enorme de substâncias, entre elas os ácidos fenólicos, os quais, por sua constituição química, possuem propriedades antioxidantes (Prado, 2009). Estes compostos apresentam, em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas (Hernández; Prieto Gonzáles, 1999), e dividem-se em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos). Os flavonoides compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais (Graham, 1992; Van Acker, 1996).

Dentre as variedades de espécies de vegetais existentes, *Camellia sinensis* (chá verde) e *Bauhinia* sp. (pata-de-vaca) são conhecidas por apresentarem esses compostos fenólicos (Salatino et al., 1999; Neto, 2008; Vuong et al., 2010) e suas folhas e galhos são, eventualmente, utilizadas como decoração ornamental em aquários ou mesmo para acidificação da água, na tentativa, muitas vezes, de induzir a desova de peixes ornamentais. Entretanto, uma vez que estes compostos podem agir como TIMPs, a diferenciação gonadal dos peixes poderia ser afetada, considerando que as MMPs podem estar presentes no processo de morfogênese gonadal, especialmente em espécies que apresentem diferenciação gonadal indireta, ou seja, condição de hermafroditismo juvenil. Em vista disto, o presente trabalho avaliou a influência de compostos naturais extraídos de folhas e troncos de *Camellia sinensis* e *Bauhinia* sp. durante a remodelação gonadal de *Danio rerio* ao longo sua diferenciação gonadal.

## 7. CONCLUSÃO

- As MMPs tem um papel extremamente importante na inversão do sexo dos animais, e que compostos naturais como os aqui utilizados - *Camellia sinensis* (chá verde) e *Bauhinia* sp. (pata-de-vaca) - mimetizam os TIMPs, sendo capazes de inibir a produção de MMPs e conseqüentemente impedir o estabelecimento do epitélio germinativo masculino em *Danio rerio*, quando utilizados em altas doses;

- A presença ou ausência da membrana basal na gônada em formação permite distinguir dois padrões de tecido gonadal que culminam com a formação de fêmeas e machos funcionais;

- É possível que as MMPs atuem diretamente no estabelecimento da membrana basal, especialmente durante o período de hermafroditismo juvenil de *Danio rerio*;

- *Camellia sinensis* (chá verde) se mostrou um composto mais eficaz que *Bauhinia* sp. ao inibir as MMPs durante a remodelação gonadal de *Danio rerio*;

- A ação dos compostos utilizados, na forma de tintura, teve ação efetiva e duradoura, indicando que a inversão sexual foi definitiva.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antoneli, F. N. (2006). Perfil morfo-funcional da inversão de sexo em *Synbranchidae* (Teleostei: Synbranchiformes).
- Baroiller, J. F., d'Cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 399-409.
- Birkedal-Hansen, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current opinion in cell biology*, 7(5), 728-735.
- Birt, D. F., Hendrich, S., Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 90(2-3), 157-177.
- Borges, A. M., Moretti, J. O. C., McManus, C., Mariante, A. D. S. (2005). Produção de populações monossexo macho de tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(2), 153-159.
- Brew, K., Dinakarandian, D., Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 267-283.
- Burns, J. R., Weitzman, S. H., Grier, H. J., Menezes, N. A. (1995). Internal fertilization, testis and sperm morphology in glandulocaudinae fishes (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*, 224(2), 131-145.
- Carvalho, H. F., Recco-Pimentel, S. M. (2007). A célula. 2ªed. *Barueri: Manole*. 380p.
- Cauty, C., Loir, M. (1995). The interstitial cells of the trout testis (*Oncorhynchus mykiss*): ultrastructural characterization and changes throughout the reproductive cycle. *Tissue and Cell*, 27(4), 383-395.
- Cesar, M.P., Murgas, L.D.S., Araújo, R.V., Drummond, C.D. (2005). Métodos para obtenção de população monossexo na piscicultura. *Boletim Agropecuário. Universidade Federal de Lavras-MG*, 69: 1-27.
- Chaves-Pozo, E., Liarte, S., Fernández-Alacid, L., Abellán, E., Meseguer, J., Mulero, V., García-Ayala, A. (2008). Pattern of expression of immune-relevant genes in the gonad of a teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Molecular immunology*, 45(10), 2998-3011.
- Chaves-Pozo, E., Mulero, V., Meseguer, J., García Ayala, A. (2005). An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biology of Reproduction*, 72(3), 593-601.

- Chaves-Pozo, E., Pelegrín, P., Mulero, V., Meseguer, J., García Ayala, A. (2003). A role for acidophilic granulocytes in the testis of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L., Teleostei). *Journal of Endocrinology*, 179(2), 165-174.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Crawford, B. D., Pilgrim, D. B. (2005). Ontogeny and regulation of matrix metalloproteinase activity in the zebrafish embryo by in vitro and in vivo zymography. *Developmental biology*, 286(2), 405-414.
- Croft, K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 435-442.
- Crouch, E. C. (1996). Basement membrane. *The lung: scientific foundations*, 53-1.
- Dammski, A. P., Müller, B. R., Gaya, C., Regonato, D. (2011). *Zebrafish-Manual de criação em Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná*, 20-1.
- De Mitcheson, Y. S., Liu, M. (2008). Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries*, 9(1), 1-43.
- De Souza, G. C., Haas, A. P. S., Von Poser, G. L., Schapoval, E. E. S., Elisabetsky, E. (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 90(1), 135-143.
- Devlin, R. H., Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3-4), 191-364.
- Domogatskaya, A., Rodin, S., Tryggvason, K. (2012). Functional diversity of laminins. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 523-553.
- Dos Santos, K. M., de Fátima Nunes, D. A., Gomes, I. N. F., de Azambuja Ribeiro, R. I. M. (2013). Caracterização e atividade de extratos de plantas de uma espécie de *Bauhinia* sobre a ação de Metaloproteinases. *BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*, 2(2esp), 20-23.
- Farmacopeia Brasileira. (2019). 6º ed. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. São Paulo: Atheneu. (Parte I, IV-7).
- Graham, H. D. (1992). Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(5), 801-805.
- Grier, H. J. (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist*, 21(2), 345-357.

- Grier, H. J. (2002). The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute (Creswell, R.L. ed.). Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium. pp. 537-552.
- Grier, H. J. (2012). Development of the follicle complex and oocyte staging in red drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). *Journal of Morphology*, 273(8), 801-829.
- Grier, H. J., Lo Nostro, F. (2000). The germinal epithelium in fish gonads: The unifying concept. In *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Biology of Fish* (pp. 233-236).
- Grier, H. J., Uribe-Aranzábal, M. C. (2009). The testis and spermatogenesis in teleosts. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)*, 8, 119-142.
- Grier, H. J., Uribe-Aranzábal, M. C., Patiño, R. (2009). The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)*, 8(Part A), 25-84.
- Hägglund, A. C., Ny, A., Leonardsson, G., Ny, T. (1999). Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Endocrinology*, 140(9), 4351-4358.
- Heemstra, P. C., Randall, J. E. (1993). Groupers of the world. *FAO Fisheries synopsis*, 16(125), 1.
- Helfman, G., Collette, B. B., Facey, D. E., Bowen, B. W. (2009). *The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology*. John Wiley & Sons.
- Hernández Ángel, M., Prieto González, E. A. (1999). Plantas que contienen polifenoles: antioxidantes dentro del estilo de vida. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(1), 12-12.
- Hipps, D. S., Hembry, R. M., DochERTY, A. J., Reynolds, J. J., Murphy, G. (1991). Purification and characterisation of human 72-kDa gelatinase (type IV collagenase). Use of immunolocalisation to demonstrate the non-coordinate regulation of the 72-kDa and 95-kDa gelatinases by human fibroblasts.
- Hoar, W. S., Randall, D. J. (Eds.). (1969). Reproduction and growth, bioluminescence, pigments, and poisons. Academic Press.
- Hulboy, D. L., Rudolph, L. A., Matrisian, L. M. (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular human reproduction*, 3(1), 27-45.
- Janssens, E., Gaublomme, D., De Groef, L., Darras, V. M., Arckens, L., Delorme, N., Claes, F., Hove, I. V., Moons, L. (2013). Matrix metalloproteinase 14 in

the *zebrafish*: an eye on retinal and retinotectal development. *PLoS one*, 8(1), e52915.

- Keow, J. Y., Herrmann, K. M., Crawford, B. D. (2011). Differential in vivo zymography: A method for observing matrix metalloproteinase activity in the *zebrafish* embryo. *Matrix Biology*, 30(3), 169-177.
- Khokha, R., Murthy, A., Weiss, A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(9), 649-665.
- Kimura, K., Cuvier, O., Hirano, T. (2001). Chromosome Condensation by a Human Condensin Complex in Xenopus Egg Extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5417-5420.
- Lambert, E., Dassé, E., Haye, B., Petitfrère, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Critical reviews in oncology/hematology*, 49(3), 187-198.
- Le Gac, F., Loir, M. (1999). Male reproductive system, fish: In E. Knobil, e JD Neill (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 20-30).
- Lieschke, G. J., Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: *zebrafish* swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353-367.
- Liu, M., De Mitcheson, Y. S. (2009). Gonad development during sexual differentiation in hatchery-produced orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) and humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae). *Aquaculture*, 287(1-2), 191-202.
- Lo Nostro, F. L. (2000). Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, synbranchidae) (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Lodi, V. M., Navarro, F. (2011). O efeito do chá verde (*Camellia Sinensis*) na redução da gordura corporal e circunferência abdominal de mulheres praticantes de Jump Fit de uma academia do município de São José-SC. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, 5(26), 4.
- Loir, M., Sourdain, P., Mendis-Handagama, S. M., Jégou, B. (1995). Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microscopy research and technique*, 32(6), 533-552.
- Longin, J., Guillaumot, P., Chauvin, M. A., Morera, A. M., Le Magueresse-Battistoni, B. (2001). MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation. *Journal of cell science*, 114(11), 2125-2134.
- Lorenzi, H., Matos, F. J. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. *Instituto Plantarum de Estudos da Flora*. 512 p.

- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a005058.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 367-389.
- Lukashev, M. E., Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in cell biology*, 8(11), 437-441.
- Madhu, R., Madhu, K., Venugopal, K. M. (2010). Sex change of hatchery produced *Amphiprion ocellaris*: Influence of mating system removal on gonad maturation and nesting success. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 52(1), 62-69.
- Mair, G. C., Abucay, J. S., Abella, T. A., Beardmore, J. A., Skibinski, D. O. F. (1997). Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(2), 396-404.
- Manfredini, V., Martins, V. D., da Silveira Benfato, M. (2013). Chá verde: Benefícios para a saúde humana. *Infarma – Ciências Farmacêuticas*, 16(9/10), 68-70.
- Martins, R. T., Almeida, D. B. D., Monteiro, F. M. D. R., Kowacs, P. A., Ramina, R. (2012). Receptores opioides até o contexto atual. *Revista Dor*, 13(1), 75-79.
- Martins, V. L., Caley, M., O'Toole, E. A. (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and Tissue Research*, 351(2), 255-268.
- Matos, F. D. A. (2000). Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. *Fortaleza: Ufc*.
- Matsubara, S., Rodriguez-Amaya, D. B. (2006). Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. *Food Science and Technology*, 26, 401-407.
- Mazzoni, T. S. (2013). Formação do epitélio germinativo e diferenciação das estruturas gonadais: uma análise comparativa entre grupos mais basais (Ostariophysi) e mais derivados (Atherinomorpha e Percomorpha) dentro de Teleostei. Tese de Doutorado. Biblioteca do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brasil, 305 p.
- Mazzoni, T. S., Quagio-Grassiotto, I. (2017). *Ovary differentiation and activity in teleostei fish*. Rijeka: InTech. pp. 129-56.
- Mazzoni, T. S., Quagio-Grassiotto, I. (2020). In totum immunostaining: A histological analysis tool for small dimensions biological samples. *International Journal of Biological & Medical Research*, 11(1), 6938-6943.

- Mazzoni, T. S., Quagio-Grassiotto, I. (2021). Presence of the matrix metalloproteinases during the migration of the primordial germ cells in zebrafish gonadal ridge. *Cell and Tissue Research*, 383(2), 707-722.
- Mazzoni, T. S., Grier, H. J., Quagio-Grassiotto, I. (2010). Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 293(9), 1581-1606.
- Mazzoni, T. S., Grier, H. J., Quagio-Grassiotto, I. (2014). Male gonadal differentiation and the paedomorphic evolution of the testis in Teleostei. *The Anatomical Record*, 297(6), 1137-1162.
- Mazzoni, T. S., Grier, H. J., Quagio-Grassiotto, I. (2015). The basement membrane and the sex establishment in the juvenile hermaphroditism during gonadal differentiation of the *Gymnocorymbus ternetzi* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *The Anatomical Record*, 298(12), 1984-2010.
- Mazzoni, T. S., Lo Nostro, F. L., Antoneli, F. N., Quagio-Grassiotto, I. (2018). Action of the metalloproteinases in gonadal remodeling during sex reversal in the sequential hermaphroditism of the teleostei fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchiformes: Synbranchidae). *Cells*, 7(5), 34.
- Meijide, F. J., Rey Vázquez, G., Grier, H. J., Lo Nostro, F. L., Guerrero, G. A. (2016). Development of the germinal epithelium and early folliculogenesis during ovarian morphogenesis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Acta Zoologica*, 97(1), 18-33.
- Miura, S., Komatsu, T., Higa, M., Bhandari, R. K., Nakamura, S., Nakamura, M. (2003). Gonadal sex differentiation in protandrous anemone fish, *Amphiprion clarkii*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1), 165-166.
- Miyazaki, S. F. (2008). Utilização do chá verde em cosméticos. *Cadernos de Prospecção*, 1(1), 10-13.
- Mylonas, C. C., Zohar, Y. (2000). Use of GnRH $\alpha$ -delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, 10(4), 463-491.
- Nagahama, Y. (1983). 6 The Functional Morphology of Teleost Gonads. *Fish physiology*, 9, 223-275.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T., e Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 362-372.
- Nakamura, S., Aoki, Y., Saito, D., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., e Tanaka, M. (2008). Sox9b/sox9a2-EGFP transgenic *medaka* reveals the morphological reorganization of the gonads and a common precursor of both the female and male supporting cells. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(3), 472-476.

- Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S. I., Tanaka, M. (2010). Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost *medaka*. *Science*, 328(5985), 1561-1563
- Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C., Pavanelli, C. S. (2001). Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação [Freshwater fish eggs and larvae: development and identification manual]. *EDUEM, Maringá, Brazil.* [In Portuguese.]
- Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.
- Neto, M. M., Neto, M. A., Braz Filho, R., Lima, M. A. S., Silveira, E. R. (2008). Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. *Biochemical systematics and ecology*, 36(3), 227-229.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nishimura, T., Sato, T., Yamamoto, Y., Watakabe, I., Ohkawa, Y., Suyama, M., Kobayashi, S. Tanaka, M. (2015). foxl3 is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in *medaka*. *Science*, 349(6245), 328-331.
- Ogiwara, K., Takano, N., Shinohara, M., Murakami, M., Takahashi, T. (2005). Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the *medaka*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8442-8447.
- Oliveira, R. M. M. D. (2012). Quantification of catechins and caffeine from green tea (*Camellia sinensis*) infusions, extract, and ready-to-drink beverages. *Food Science and Technology*, 32, 163-166.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular cell biology*, 8(3), 221-233.
- Pelzer, E. (1998). Acute and chronic Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *il Farmaco*. v. 53.
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1-4), 229-281.
- Popma, T. J., Green, B. W. (1990). Reversão sexual de tilápias em tanques de terra. *Manual de produção em aquacultura*.
- Powell, W. C., Matrisian, L. M. (1996). Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Attempts to Understand Metastasis Formation I*, 1-21.

- Prado, A. (2009). Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. *Piracicaba-SP: Universidade de São Paulo*.
- Pudney, J. (1996). Comparative cytology of the Leydig cell. *The leydig cell*, 611-57.
- Quagio-Grassiotto, I., Grier, H. J., Mazzoni, T. S., Nóbrega, R. H., Amorim, J. P. (2011). Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). *Journal Morphology*, 272, 1290-1306.
- Quintero-Hunter, I., Grier, H. Muscato, M. (1991). Enhancement of histological detail using Metanil Yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotech. Histochemistry*, 66: 169-172.
- Raj Kapoor, B., Jayakar, B., Murugesh, N., Sakthisekaran, D. (2006). Chemoprevention and cytotoxic effect of *Bauhinia variegata* against N-nitrosodiethylamine induced liver tumors and human cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology*, 104(3), 407-409.
- Reinboth, R. (1988). Physiological problems of teleost ambisexuality. *Environmental biology of fishes*, 22(4), 249-259.
- Reis, V. R., De Almeida, F. L., Piferrer, F. (2016). Produção de populações monossexo em peixes. *Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Ribeiro, R. I. M. A., Kuribayashi, J. S., Júnior, P. C. B., Beletti, M. E., Espíndola, F. S., Cassali, G. D., Loyola, A. M. (2010). Inibição de metaloproteinases por extratos aquosos de *Aloe vera*, *Annona muricata* e chá preto. *Bioscience Journal*, 26(1).
- Sadovy, Y., Shapiro, D. Y. (1987). Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*, 136-156.
- Saigg, N. L., Silva, M. C. (2009). Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. *Universitas: Ciências da Saúde*, 7(1), 69-89.
- Salatino, A., Blatt, C. T., Santos, D. Y. D., Vaz, A. M. (1999). Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. *Brazilian Journal of Botany*, 22, 17-20.
- Santana, J. C., Quagio-Grassiotto, I. (2014). Extracellular matrix remodeling of the testes through the male reproductive cycle in Teleostei fish. *Fish physiology and biochemistry*, 40(6), 1863-1875.
- Schiedeck, G., Bevilaqua, G. A. P., Nachtigal, G. D. F., Bauer, M. D. L. (2008). Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. *Embrapa Clima Temperado-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.
- Schmidt, M., Schmitz, H. J., Baumgart, A., Guedon, D., Netsch, M. I., Kreuter, M.





- H., Schrenk, D. (2005). Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food and Chemical Toxicology*, 43(2), 307-314.
- Schmitz, W., Saito, A. Y., Estevão, D., Saridakis, H. O. (2005). O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 26(2), 119-130.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390-411.
- Siegfried, K. R., Nüsslein-Volhard, C. (2008). Germline control of female sex determination in zebrafish. *Developmental Biology*, 324(2), 277-287.
- Silva, K. L. D., Cechinel Filho, V. (2002). Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, 25(3), 449-454.
- Silva, P. S., Navarro, F. (2007). Efeitos da ingestão de chá verde sobre a oxidação lipídica no sedentarismo e no exercício. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, 1(3), 45-60.
- Sonaglio, D., Ortega, G. G., Petrovick, P. R., Bassani, V. L. (2003). Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 5, 289-326.
- Strüssmann, C. A., Takashima, F., Toda, K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, 139(1-2), 31-45.
- Takabayashi, F., Tahara, S., Kaneko, T., Harada, N. (2004). Effect of green tea catechins on oxidative DNA damage of hamster pancreas and liver induced by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine and/or oxidized soybean oil. *Biofactors*, 21(1-4), 335-337.
- Takahashi, H. (1977). Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 28(2), 57-65.
- Takahashi, H., Shimizu, M. (1983). Juvenile intersexuality in a cyprinid fish, the Sumatra barb, *Barbus tetrazona tetrazona*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 34(2), 69-78.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical journal of Pharmaceutical research*, 7(3), 1089-1099.
- Teixeira, J. B. P., dos Santos, J. V., Ufjt, T. (2011). Fitoterápicos e interações medicamentosas.
- Thomé, R., Dos Santos, H. B., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N. (2010). Distribution of laminin  $\beta$ 2, collagen type IV, fibronectin and MMP-9 in ovaries of the teleost fish. *Journal of molecular histology*, 41(4), 215-224.

- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, 205(6), 711-718.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T. (2004). 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 Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(1), 11-20.
- Valentin, F. N., Batlouni, S. R., Nascimento, N. F., Silva, R. C., Manzini, B., Hilbig, C. C., Santos, M.P., Nakaghi, L. S. O. (2016). Ovarian differentiation and development in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*. *Journal of fish biology*, 89(1), 445-466.
- Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.
- Vaz, A. M. S. F. (2010). Bauhinia in Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Available from <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB082666>.
- Vaz, A. M. S., Tozzi, A. M. G. (2005). Sinopse de Bauhinia sect. Pauletia (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. *Brazilian Journal of Botany*, 28, 477-491.
- Vazzoler, A. E. A. M. (1996). Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. *Maringá: Eduem*, 169.
- Velloso, C. C., Peglow, K. (2003). *Plantas medicinais*. EMATER, RS: ASCAR.
- Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827-839.
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Nguyen, M., Roach, P. D. (2010). Extraction and isolation of catechins from tea. *Journal of separation science*, 33(21), 3415-3428.
- Woessner Jr, J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal*, 5(8), 2145-2154.
- Wu, G. C., Tomy, S., Lee, M. F., Lee, Y. H., Yueh, W. S., Lin, C. J., Lau, E.L., Chang, C. F. (2010). Sex differentiation and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *General and Comparative Endocrinology*, 167(3), 417-421.
- Wu, S. C., Yen, G. C., Wang, B. S., Chiu, C. K., Yen, W. J., Chang, L. W., Duh, P. D. (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT-Food Science and Technology*, 40(3), 506-512.


- Yamamoto, T. O. (1969). 3 Sex Differentiation. In *Fish physiology* (Vol. 3, pp. 117-175). Academic Press.
- Zhang, J., Bai, S., Tanase, C., Nagase, H., Sarras, M. P. (2003a). The expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) is required for normal development of *zebrafish* embryos. *Development Genes and Evolution*, 213(8), 382-389.
- Zhang, J., Bai, S., Zhang, X., Nagase, H., Sarras Jr, M. P. (2003b). The expression of novel membrane-type matrix metalloproteinase isoforms is required for normal development of *zebrafish* embryos. *Matrix Biology*, 22(3), 279-293.
- Zhang, J., Bai, S., Zhang, X., Nagase, H., Sarras, M. P. (2003c). The expression of gelatinase A (MMP-2) is required for normal development of *zebrafish* embryos. *Development Genes and Evolution*, 213(9), 456-463.

## ANEXO I

### APROVAÇÃO DO PELA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUA - UNIFAL)

	<b>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO</b> <b>Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG</b> Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG CEP 37130-000 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063	
<b>Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL</b>		
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Regulação das Metaloproteinases (MMPs) a partir de Compostos Naturais na Diferenciação Gonadal durante o Hermafroditismo Juvenil de <i>Danio rerio</i>", registrada com o nº 39/2017, sob a responsabilidade de Talita Sarah Mazzoni, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.</p>		
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica	
Vigência da autorização	De 07/07/2017 a 31/05/2018	
Espécie/linhagem/raça	Peixe / <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	
Nº de animais	16	
Sexo	Machos: 12 Fêmeas: 4	
Origem	Loja de aquarismo	

Alfenas, 04 de Julho de 2017.

  
Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
Coordenador CEUA-UNIFAL