

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/07/2023.



Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

JHENNIFER GOMES CORDEIRO

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

Jhennifer Gomes Cordeiro

Orientador: José Augusto Senhorini

Coorientador: Paulo Sérgio Monzani

Coorientador: Diógenes Henrique de Siqueira Silva

Botucatu, SP

2021

JHENNIFER GOMES CORDEIRO

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

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

Orientador: José Augusto Senhorini.

Coorientador: Paulo Sérgio Monzani.

Coorientador: Diógenes Henrique de Siqueira Silva.

Botucatu, SP
2021

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICO

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

Aos meus pais, por me apoiarem nessa jornada

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

Lista de Figuras

Capítulo 1

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

Capítulo 2

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

Lista de Tabelas

Capítulo 1

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

Capítulo 2

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

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

5. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- BLÁZQUEZ, M. et al. Cloning and sequence analysis of a vasa homolog in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*): tissue distribution and mrna expression levels during early development and sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 322-333, 2011.
- BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of Piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture nutrition**, v. 12, p. 183 – 191, 2006.
- BRAAT, A. K. et al. Characterization of Zebrafish Primordial Germ Cells: Morphology and Early Distribution of *vasa* RNA. **Developmental Dynamics**, v. 216, p. 153–167, 1999.
- BROWN-PETERSON, N.J. et al. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries**, v. 3, p. 52–70, 2011.
- CASTRO, J. P. et al. Differential Expression of Genes Related to Sexual Determination Can Modify the Reproductive Cycle of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) in B Chromosome Carrier Individuals. **Genes**, v. 909, p. 1-12, 2019.
- CLARKSON, Y. L. et al. Extracellular Localisation of the C-Terminus of DDX4 Confirmed by Immunocytochemistry and Fluorescence-Activated Cell Sorting. **Cells**, v. 578, n. 8, p. 1-15, 2019.
- CHIANG, E. F. et al. Two *Cyp19* (P450 Aromatase) Genes on Duplicated Zebrafish Chromosomes Are Expressed in Ovary or Brain. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 4, p. 542–550, 2001.
- CHESHENKO, K. et al. Expression of Zebra Fish Aromatase *cyp19a* and *cyp19b* Genes in Response to the Ligands of Estrogen Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor. **Toxicological sciences**, v. 96, n. 2, p. 255–267, 2007.
- CHEN, L. et al., Perfluorobutanesulfonate Exposure Skews Sex Ratio in Fish and Transgenerationally Impairs Reproduction. **Environmental Science & Technology**, v. 53, p. 8389–8397, 2019.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- TONELLA, L. H. et al. Conservation status and bio-ecology of *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Bryconidae), an endemic fish species from the Paraná River basin (Brazil) threatened with extinction. **Neotropical Ichthyology**, v.7, n. 3, 2019.
- TIAN, C. et al. DExD/H-box RNA helicase genes are differentially expressed between males and females during the critical period of male sex differentiation in channel catfish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 22, p. 109–119, 2017.
- USHIDA, D. et al. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137, p. 11–20, 2004.
- VILELA, C.; HAYASHI, C. Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 11758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 491 – 496, 2001.
- YAN, T. et al. Characterization and expression profiles of *cyp19a1a* in the schizothoracine fish *Schizothorax prenanti*. **Tissue and Cell**, v. 58, p. 70–75, 2019.
- YASUI, G. S. et al. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. **Journal of animal Science**, v. 89, n. 8, p. 2380-2388, 2011.
- YOKOI, H. et al. *sox9* in a Teleost Fish, Medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for Diversified Function of Sox9 in Gonad Differentiation. **Molecular Reproduction And Development**, v. 63, p. 5–16, 2002.
- YOON, C.; KAWAKAMI, K.; HOPKINS, N. Zebrafish vasahomologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. **Development**, v. 124, p. 3157-3166, 1997.
- WAGNER, T. et al. Autosomal Sex Reversal and Campomelic Dysplasia Are Caused by Mutations in and around the SRY-Related Gene SOX9. **Cell**, v. 79, 1111-1120, 1994.

- WANG, D. et al. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 83–89, 2004.
- WANG, D. et al. *Foxl2* Up-Regulates Aromatase Gene Transcription in a Female-Specific Manner by Binding to the Promoter as Well as Interacting with Ad4 Binding Protein/Steroidogenic Factor 1. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 3, p. 712–725, 2007.
- WEDEKIND, C. Fish populations surviving estrogen pollution. **BMC Biology**, v. 12, n. 10, p. 1-3, 2014.
- WOODLING, J. D. et al. Intersex and other reproductive disruption of fish in wastewater effluent dominated Colorado streams. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 10–15, 2006.
- WU, G. C. et al. Dual Roles of *cyp19a1a* in Gonadal Sex Differentiation and Development in the Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 1111–1120, 2008.
- XIN, M. et al. Molecular and subcellular cryoinjury of fish spermatozoa and approaches to improve cryopreservation. **Aquaculture**, v. 12, p. 1-16, 2019.
- ZARDO, E. L. et al. Gonadal development period and sexual differentiation through histological analysis in *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Bryconidae). **Aquaculture**, v. 539, 2021
- ZHANG, Y. et al. Expression profiles of amhy and major sex-related genes during gonadal sex differentiation and their relation with genotypic and temperature- dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **General and Comparative Endocrinology**, 2018.