Carolina Pereira Gomes

Reprodução em *Characidium schubarti* (Teleostei: Characiformes): análise da reprodução em cativeiro e de genes relacionados à diferenciação sexual (*dmrt1*, *cyp19a1a* e *amh*).

Reproduction in *Characidium schubarti* (Teleostei: Characiformes): analysis of captive breeding and of genes related to sex differentiation (*dmrt1*, *cyp19a1a* and *amh*).

São Paulo

2013

Carolina Pereira Gomes

Reprodução em *Characidium schubarti* (Teleostei: Characiformes): análise da reprodução em cativeiro e de genes relacionados à diferenciação sexual (*dmrt1*, *cyp19a1a* e *amh*).

Reproduction in *Characidium schubarti* (Teleostei: Characiformes): analysis of captive breeding and of genes related to sex differentiation (*dmrt1*, *cyp19a1a* and *amh*).

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Biologia (Genética), na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Gomes, Carolina Pereira
Reprodução em *Characidium schubarti*
(Teleostei: Characiformes): análise da
reprodução em cativeiro e de genes
relacionados à diferenciação sexual (*dmrt1*,
cyp19a1a e *amh*).

Número de páginas 95

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. *Characidium schubarti* 2.
Reprodução 3. *dmrt1* 4. *cyp19a1a* I.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

Comissão julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Ao meu marido Humberto e aos meus pais
Nestor e Eliana por acreditarem nos meus sonhos.

“É melhor lançar-se à luta em busca do triunfo mesmo expondo-se ao insucesso, que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito; E vivem nessa penumbra cinzenta sem conhecer nem vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

Agradecimentos

Encerra-se aqui, parte de um longo caminho de sonhos que se iniciaram no ano de 2006, quando ingressei na Biologia. Foi com este trabalho que aprendi que a ciência, mesmo sendo por vezes difícil, pode ser em muitos momentos, também prazerosa.

Foram vários os momentos difíceis até aqui, mas que me mostraram que é sim possível conseguir (mesmo que não da forma que esperávamos), quando temos boa vontade, coragem e acima de tudo apoio de pessoas queridas.

E como diz a máxima “quem segue sozinho chega mais rápido, mas quem segue acompanhado consegue ir mais longe”, aqui vão alguns agradecimentos:

Ao meu marido Humberto, por me esperar, me amar e acreditar em cada passo que eu dou, mesmo nos tortos. *"Eu gostaria de lhe agradecer pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou. Pela sua capacidade de me olhar devagar, já que nessa vida muita gente já me olhou depressa demais."* Pr. Fabio de Melo.

Aos meus pais Nestor e Eliana, que mais uma vez foram os maiores incentivadores e patrocinadores deste sonho, pela paciência nos momentos em que achei que não fosse conseguir seguir em frente e pela sempre confiança na minha capacidade. Amo vocês!

À minha irmã Tata, por me puxar pra cima sempre que preciso, pelo incentivo e carinho em todos os momentos até aqui. Você é sempre um grande exemplo de força e garra pra mim, e em breve voltaremos a dividir tantos momentos e lugares incríveis juntas!

Aos meus sogros Flavia e Douglas pelo amor e por me proporcionar momentos tão maravilhosos, quando mais precisei deles.

Aos amigos que fiz durante o mestrado e que formaram um grande e forte alicerce para que meu trabalho fosse concluído: Ju Jordão, aos meus dindos Juju e Renan, Caçulinha, Felipe, Adam, Danilo, Amandinha, Ana, Anita, Mari, Rivi, Mauro, Leandro, Lili e Marco. Pelas conversas, incontáveis ajudas, por me ouvirem chorar quando foi inevitável, pelos momentos cheios de risos e por me darem coragem quando essa falhou. Sou grata pela sorte de ter encontrado vocês pelo caminho.

Ao técnico e amigo Carlos, por acreditar mesmo nos dias de chuva. Obrigada por tudo que você pode me ensinar. E Marta, pelas ajudas nas coletas!

Ao amigo Fabricio, por todo apoio e por ter feito parte de momentos tão felizes em minha vida. Obrigada sempre.

À Dra. Lurdes Foresti, por ter me recebido na USP e aberto as portas da pós-graduação pra mim com animo e atenção.

Ao Dr. Ricardo Hattori, por ter sido essencial no início deste projeto e por ter acreditado que ele era possível.

Ao técnico Francisco, pela grande ajuda e companhia nas coletas.

Às secretarias Helenice, Patrícia, Deisy e Shirlene por serem sempre prestativas e atenciosas.

Aos motoristas do Instituto de Biociências, por estarem sempre dispostos a nos ajudar durante todas as coletas.

Às amigas que mesmo distantes são sempre tão presentes e que fazem meu dia mais colorido. Sou feliz por poder dizer que são muitos os nomes, mas vocês saberão quem são. Obrigada por tantos sorrisos.

À Alessandra, por ter me mostrado tantas possibilidades e caminhos que sozinha, eu jamais encontraria.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual este projeto não seria possível.

À CAPES pela ajuda financeira no início do projeto.

Minha gratidão a todos vocês que estão presentes em cada página desta dissertação.

Índice

Introdução Geral	01
Objetivos	18
Capítulo 1. Identificação de genes relacionados à diferenciação sexual em espécie de teleósteo Neotropical, <i>Characidium schubarti</i> (Characiformes).	19
Capítulo 2. Identificação de genes relacionados à diferenciação sexual em espécie de teleósteo Neotropical, <i>Characidium schubarti</i> (Characiformes).	46
Discussão Geral e Conclusões	70
Resumo	75
<i>Abstract</i>	76
Referências Bibliográficas	77

Introdução Geral

1.1 Biologia Reprodutiva de teleósteos

O grupo teleósteo, uma subdivisão de Actinopterygii, é o mais rico em espécies e diversidade dentre os vertebrados (Vazzoler, 1996). O grupo possui cerca de 27.000 espécies, e representa aproximadamente 50% do total de vertebrados e 96% do total de espécies de peixes presentes no planeta; sendo subdividido em 40 ordens, 448 famílias e 4064 gêneros (Vazzoler, 1996; Nelson, 2006). Esta variedade de espécies apresenta as mais variadas formas e padrões reprodutivos dentre os vertebrados.

O sucesso de qualquer espécie é determinado pela aptidão de seus membros se reproduzirem em ambientes instáveis e desse modo, manter a viabilidade das populações nesses habitats (Vazzoler, 1996). Os teleósteos apresentam estratégias reprodutivas variadas englobando táticas diversas, que permitiram sua adaptação a ambientes nos quais tanto as condições bióticas, como disponibilidade de alimento e pressão de predação, quanto às abióticas como temperatura, fotoperíodo e oxigênio disponível, variam amplamente no espaço e no tempo (Vazzoler, 1996; Moyle & Cech, 2004).

O ciclo de vida dos peixes teleósteos é usualmente dividido em cinco períodos de desenvolvimento: embrião, larva, juvenil, adulto e senescente. Ao longo da vida, as diferentes fases do desenvolvimento estão intimamente relacionadas à alimentação, ao crescimento e à reprodução, que por sua vez, está ligada às condições ambientais presentes nos habitats de cada espécie (Vazzoler, 1996; Moyle & Cech, 2004).

A fase embrionária compreende o período no qual o desenvolvimento possui dependência nutricional da mãe. Durante a fase larval, que distingue os peixes ósseos dos cartilagosos, já é possível observar habilidades em capturar alimentos. Na fase juvenil

os órgãos estão em uma etapa avançada de desenvolvimento e formação e na fase adulta, estes estão por fim, já totalmente formados, principalmente as gônadas. É nesta etapa que também ocorre o desenvolvimento de estruturas reprodutivas e padrões de comportamento relacionados ao comportamento reprodutivo, como a corte. O período senescente é caracterizado pela desaceleração do crescimento e a degeneração das gônadas, ou seja, os indivíduos nesta etapa não produzem mais gametas e conseqüentemente, não mais se reproduzem (Moyle & Cech, 2004).

As suas estratégias reprodutivas são tão diversas quanto às adaptações aos numerosos ambientes aquáticos distintos em que os peixes habitam; tal diversidade pode concernir à sexualidade, desova, ao comportamento parental, e também à sensibilidade a sinais dados pelo ambiente (Bone & Moore, 2008).

Os teleósteos apresentam todos os tipos de mecanismos de reprodução sexuada observados nos vertebrados em geral, e apresentam também, reprodução assexuada em algumas espécies além de outros mecanismos observados que são considerados únicos no reino animal (Vazzoler, 1996).

Considerando então os modos e estratégias reprodutivas, os peixes teleósteos podem ser divididos em gonocóricos, sendo aqueles que apresentam indivíduos fêmeas ou machos apenas e são os mais comuns entre os teleósteos, um exemplo é o gênero *Chararacidium*, alvo do presente estudo; e hermafroditas, aqueles que possuem gônadas que atuam como ovários e/ou como testículos. O hermafrodita pode ser do tipo simultâneo, em que as gônadas apresentarão, ao mesmo tempo, porções femininas e masculinas ou do tipo sequencial, o qual é dividido em duas subcategorias:

- Protândricos, aqueles em que as gônadas funcionam primeiramente como masculinas;
- Protogínicos, aqueles em que as gônadas funcionam primeiramente como femininas (Vazzoler, 1996; Larson, 2011).

Esta mudança no sexo dos indivíduos pode ocorrer por influência do ambiente físico ou social no qual a espécie está inserida (Devlin & Nagahama, 2002).

Pelo menos 14 famílias dentre os teleósteos possuem hermafroditas protogínicos, sendo 11 delas peixes de recife de coral; as famílias de peixes Scaridae, Labridae e Serranidae são quase exclusivamente, constituídas por hermafroditas protogínicos. Já os hermafroditas protândricos ocorrem em 8 famílias, nas quais 3 destas são representadas por peixes de recife de coral; o exemplo mais conhecido de peixe protândrico é o gênero *Amphiprion*, popularmente conhecido como peixe Palhaço (Larson, 2011).

Estratégias alternativas de reprodução também são observadas nos teleósteos, como o mecanismo assexuado partenogênese, onde o ovócito se desenvolve sem qualquer participação do espermatozoide, e o mecanismo ginogenético, em que as populações são constituídas apenas por fêmeas triplóides, o ovócito neste caso, é ativado por um espermatozoide, porém este não contribuirá geneticamente à nova geração; este mecanismo é considerado por alguns autores como uma forma de partenogênese (Vazzoler, 1996).

Um exemplo clássico de espécie teleósteo que apresenta reprodução partenogenética é a *Poecilia formosa*, uma espécie tropical da ordem Cyprinodontiformes (Herrero *et al.*, 2000).

Os teleósteos podem ainda ser descritos em relação ao comportamento parental que apresentam após a fertilização dos ovos, já que podem despende energia de diferentes formas no cuidado da prole, associada a outras características como ambientes selecionados para deposição dos gametas ou dos ovos, sendo classificados, portanto, como não guardiões, guardiões ou portadores.

As espécies não guardiãs são aquelas que não protegem seus ovos e jovens, desovando em substrato aberto. Já as espécies guardiãs, cuidam dos ovos e dos embriões até que ocorra a eclosão ou, em alguns casos, até a fase larval apresentando

comportamento de corte elaborado e também comportamento territorialista. As espécies consideradas portadoras são aquelas que carregam embriões ou em alguns casos, os jovens, externa ou internamente ao corpo. Nos teleósteos a grande maioria das espécies são não guardiãs, seguindo-se de guardiãs e portadoras (Vazzoler, 1996; Moyle & Cech, 2004).

Cerca de 20% das famílias de peixes teleósteos apresentam algum tipo de cuidado parental (Gittleman, 1981, Kolm, 2009). Dentre os tipos de cuidados, os guardiões de ovos são os mais comuns, sendo representado por cerca de 95% dos teleósteos que apresentam comportamento relacionado ao cuidado com a prole; algumas espécies de ciclídeos (Cichlidae), guardam os ovos por alguns dias até a eclosão, outras (*Boulengerochromis micropelis*) seguem guardado mesmo após a eclosão por até 9 meses. Além disso, espécies de ciclídeos podem apresentar também comportamento portador (Kolm, 2009).

Em algumas espécies portadoras, ovos podem ser tomados para ser incubados na cavidade bucal: pelas fêmeas em *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) ou pelo macho em *Tilapia zilli*. O cavalo marinho macho (*Hippocampus spp.*), por exemplo, transporta os ovos dentro de uma bolsa para incubar. (Evans *et al.*, 2005).

Sendo parte vital do desenvolvimento e manutenção das espécies, o conhecimento da biologia reprodutiva é item essencial para a compreensão da biologia geral das mesmas. Considerando ainda que os peixes têm grande importância econômica, tal conhecimento auxilia em práticas de pesca e aquiculturas bem sucedidas.

Os estudos que abordam os aspectos reprodutivos dos peixes permitem compreender o ciclo reprodutivo e de vida das espécies, como as gônadas se desenvolvem e ainda como a proporção sexual apresenta-se nas populações, bem como, permitem analisar a estratégia adotada pelas espécies para alcançar o sucesso reprodutivo

(Sadovy & Shapiro, 1987). Além disso, os peixes representam modelos de estudos de reprodução para vertebrados superiores (Bone & Moore, 2008).

1.2 Hormônios envolvidos na reprodução de peixes teleósteos

Os processos fisiológicos que estão envolvidos na reprodução dos teleósteos compreendem a diferenciação das gônadas em ovários e testículos, a partir de uma gônada indiferenciada e bipotencial, a produção de gametas (gametogênese) e a liberação destes para ser possível então a fertilização – em espécies com fecundação externa - e por fim a eclosão dos ovos já fertilizados (Ribeiro & Moreira, 2012).

Todos esses eventos interagem com outros processos fisiológicos, como a nutrição, a osmoregulação, o crescimento e também com fatores de estresse, principalmente em casos de aquicultura. Além disso, fatores abióticos, como os ambientais e as interações sociais influenciam de forma direta em todos os eventos citados acima (Ribeiro & Moreira, 2012).

Essa gama complexa de eventos que formam a cascata reprodutiva é controlada por inúmeros fatores endócrinos ao longo do eixo principal relacionado à reprodução, o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Este se comunica com o ambiente por meio de órgãos do sentido, que estimulam o hipotálamo, este por sua vez, transmite sinais para a hipófise, ou também conhecida como glândula pituitária, por meio de fibras nervosas transportando hormônios GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) (Evans & Claiborne, 2005; da Costa *et al.*, 2012).

O hormônio GnRH é responsável por estimular a hipófise a produzir os hormônios gonadotrópicos, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante); as gonadotrofinas pituitárias têm papel central na regulação da gametogênese e na liberação

de hormônios gonadotróficos, os esteroides sexuais, que são produzidos nas gônadas e também no encéfalo em peixes teleósteos (Swanson *et al.*, 2003)

Nas fêmeas, hormônios esteroides são os estrógenos, os quais controlam a vitelogênese, e os progestógenos que promovem a maturação dos folículos e a ovulação final. Já no macho, os esteroides sexuais são por sua vez, andrógenos, os quais regulam a espermatogênese e a espermição final (Evans & Claiborne, 2005).

Esteroides têm efeito local direto no desenvolvimento de células germinativas, mas agem também como hormônios endócrinos para influenciar tipos de células e órgãos envolvidos na diferenciação do sexo, além disso, são responsáveis também, pelo comportamento sexual e características sexuais secundárias em todos os vertebrados (Swanson *et al.*, 2003).

O 17 β -estradiol, principal hormônio esteroide agente nas fêmeas, é encontrado em níveis muito mais altos nestas em relação ao nível que se observa em machos, e se acredita que seja o principal hormônio responsável por induzir e manter o desenvolvimento dos ovários nas fêmeas (Yamamoto, 1969). Nos machos, observam-se dois tipos principais de esteroides, a 11-cetotestosterona e a testosterona, sendo o primeiro, o principal andrógeno envolvido no desenvolvimento testicular de peixes teleósteos (Devlin & Nagahama, 2002). A relação dos hormônios andrógenos com a diferenciação do sexo em machos ainda é controversa, já que a síntese deste hormônio nem sempre é detectada antes da diferenciação da gônada bipotencial em testículos (Nakamura *et al.*, 2003).

Sendo a reprodução um processo fisiológico e endócrino complexo, são muitas as enzimas que participam direta e indiretamente nesta via. A enzima aromatase (P450 aromatase) é responsável por gerar 17 β -estradiol a partir da aromatização de moléculas de testosterona. Os efeitos complexos do estrógeno na diferenciação sexual de peixes são

mediados amplamente por meio de mudanças na atividade e expressão da enzima aromatase (P450) (Liu *et al.*, 2007; Norris & Lopez, 2011).

Estudos mostraram que a inibição da aromatase em embriões leva ao surgimento de indivíduos fenotipicamente machos, demonstrando então o seu importante papel na diferenciação sexual de peixes teleósteos (Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2008).

1.3A determinação e diferenciação genéticas do sexo em teleósteos

Distinções morfológicas entre machos e fêmeas são observadas em uma grande maioria das espécies animais. Como e porque o sexo evolui e se mantém na maioria dos organismos vivos permanece uma questão a ser respondida por estudos de biologia evolutiva e do desenvolvimento (Huang *et al.*, 2005).

Os teleósteos são um grupo conhecido também por sua diversidade e plasticidade sexual; seus mecanismos de determinação do sexo e sua flexibilidade na diferenciação sexual são temas de numerosos estudos e publicações atuais (Pandian, 2012).

Cabe ressaltar que, apesar de serem processos relacionados, a determinação e a diferenciação do sexo são eventos que apresentam diferenças em suas definições básicas. A determinação sexual em teleósteos é um evento que pode durar minutos ou até mesmo segundos, já a diferenciação que a segue é um processo mais longo, sendo ambas ações intimamente relacionadas no decorrer do ciclo de vida dos peixes (Pandian, 2012).

A determinação sexual é o momento onde há probabilidade de encontro entre espermatozoides e ovócitos; este evento determina o sexo da progênie decorrente da fertilização dos ovócitos. Nas espécies com cromossomos sexuais heteromórficos, como aves e mamíferos e maioria dos peixes teleósteos, o sexo é determinado na fecundação pela herança diferencial de cromossomos sexuais. Subsequentemente, o processo de diferenciação sexual, através do qual a progênie é “sexualizada”, ou seja, adquiri

características sexuais secundárias e/ou comportamentos sexuais diferenciados, é iniciada e pode durar quase toda a vida reprodutiva (Pandian, 2012; Cutting *et al.*, 2013).

Há dois tipos principais de mecanismos envolvidos na determinação sexual, mecanismos monofatoriais ou polifatoriais; no primeiro caso, o sexo é determinado por um gene principal que está presente nos cromossomos sexuais, e também por genes em outros cromossomos que possuem importância no restante da via fisiológica do sexo; o segundo mecanismo está associado com o papel do acúmulo de ação gênica de todos os fatores envolvidos na determinação, não apenas com um loci gênico (Devlin & Nagahama, 2002; Sandra & Norma, 2010).

A diferenciação sexual deste grupo não é um processo decisivo como é observado nos mamíferos, onde uma vez determinado o sexo, segue-se um caminho único de desenvolvimento gerando testículos ou ovários totalmente diferenciados (Capel, 1998).

Em contraste, os teleósteos apresentam diversas exceções a este mecanismo, podendo ser o desenvolvimento gonadal influenciado por flutuações de fatores intrínsecos como os hormônios, o crescimento ou o próprio comportamento, ou por fatores extrínsecos como os ambientais (luz e temperatura) e ainda à exposição a compostos xenobióticos – como hormônios provenientes da pecuária ou esgoto – ou até mesmo a poluição, um mau presente em grande parte dos ambientes aquáticos onde há a influência antrópica (Patiño *et al.*, 1996; Devlin & Nagahama, 2002; Senior *et al.*, 2012).

As gônadas de peixes são geralmente muito instáveis, mas uma vez que um perfil de desenvolvimento particular (macho ou fêmea) foi direcionado por controles intrínsecos, como os hormônios, o estado de diferenciação gonadal pode então ser considerado estável ao longo do desenvolvimento subsequente em espécies gonocóricas. Esta estabilidade é alcançada por meio da constância dos padrões de expressão dos genes e os mecanismos de reação para assegurar sinais celulares e hormonais consistentes (Devlin & Nagahama, 2002).

Apesar de os teleósteos possuírem uma biologia e ecologia que promovem exemplos únicos de mecanismos de determinação sexual, estes apresentam muitos processos e vias semelhantes àquelas observadas em outros vertebrados, sendo uma rica fonte de material para estudos acadêmicos e aplicados sobre o tema, já que fornecem *insights* sobre a plasticidade do processo de determinação e diferenciação do sexo (Devlin & Nagahama, 2002; Kikuchi & Hamaguchi, 2013).

1.4 Controle genético da determinação e diferenciação sexual em peixes teleósteos

1.4.1 Sistemas cromossômicos

O dimorfismo sexual pode ser detectado por características morfológicas e/ou por características genéticas como, por exemplo, a presença de cromossomos sexuais diferenciados. Diversos sistemas de determinação sexual evoluíram de forma independente nos reinos animal e vegetal. Os mais conservados entre estes sistemas consiste naqueles em que o macho é heterogamético e a fêmea homogamética (XY/XX), e o sistema em que a fêmea é heterogamética e o macho homogamético (ZW/ZZ), sendo este último o sistema mais comum entre teleósteos neotropicais (Cioffi *et al.*, 2012; Kamiya *et al.*, 2012).

Peixes possuem uma enorme diversidade em seus sistemas de determinação sexual, envolvendo cromossomos múltiplos como, por exemplo, XX:XXY, ou simples, como os sistemas já apresentados acima XX:XY, ZZ:ZW ou ainda sistemas como XX:X0, ou ainda ser considerados como poligênicos, onde não há a diferenciação sexual dos cromossomos. (Devlin & Nagahama, 2002).

Essa grande variedade de sistemas de determinação sexual é observada principalmente em animais da região Neotropical. Segundo estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2007) cerca de 1.040 espécies dessa região já foram estudadas citogeneticamente, sendo que,

em 62 dessas espécies, foram observados cromossomos sexuais diferenciados. Dentre estas, a maioria (40 espécies) apresentou heterogamia feminina (ZZ/ZW) (Devlin & Nagahama, 2002; Maistro *et al.*, 1998).

Sendo assim teleósteos Neotropicais, são considerados bons modelos para analisar o processo de diferenciação dos cromossomos sexuais, pois, além da grande variedade de sistemas, observa-se ainda a presença de cromossomos sexuais não diferenciados em muitas espécies (Cioffi *et al.*, 2010).

A literatura sugere que esta variedade dos mecanismos de determinação do sexo e de sistemas cromossômicos pode estar evoluindo independentemente em diferentes espécies de peixes teleósteos (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004). Em relação à origem e evolução dos sistemas cromossômicos encontrados no grupo, segundo Ohno (1967), sistemas simples evoluem quando um par comum de cromossomos cessa sua recombinação e então surge uma divergência gradual entre eles.

Na literatura atual, a explicação mais plausível para a origem independente dos cromossomos sexuais em peixes é a que diferentes genes primários de diferenciação sexual podem evoluir em diferentes cromossomos.

Nestes cromossomos, um gene autossômico ou um gene duplicado pode adquirir uma nova mutação que poderá dar então origem ao desenvolvimento do sexo masculino (neo-Y) ou do sexo feminino (neo-W). Esta mudança tem como resultado final o novo gene de diferenciação do sexo, denominado na literatura como gene mestre (ou *upstream*), e o surgimento por sua vez, de novos cromossomos sexuais a partir de autossomos que têm agora conteúdo gênico distintos entre si; haverá uma redução da taxa de recombinação entre eles, o qual é crucial na diferenciação dos cromossomos sexuais (Takehana *et al.*, 2007).

A plasticidade dos sistemas cromossômicos tem relação também com componentes genômicos como os elementos transponíveis e DNA satélites, que contribuem para a

variação dentro e entre as espécies. Estudos sugerem que tais elementos podem também ter importante papel no nível cromossômico e nuclear, já que os mesmos são capazes de mudar a composição molecular de cromossomos sexuais e reduzir a taxa de recombinação entre eles (Kejnousky, 2009).

O grau de especialização dos cromossomos é definido com base no nível de diferenciação morfológica, decorrente da especialização funcional do cromossomo em questão. Tipicamente, um sistema sexual é considerado altamente diferenciado quando é observada uma grande distinção de tamanho, conteúdo gênico e quantidade de sequências heterocromáticas no par (Charlesworth *et al.*, 2005).

1.4.2 Genes envolvidos na diferenciação do sexo em teleósteos: *dmrt1*, *cyp19a1a* e *amh*.

A arquitetura gênica do desenvolvimento sexual pode ser poligênica ou monofatorial, onde é determinada por genes principais, envolvendo desta forma, uma cascata gênica. Os genes envolvidos na diferenciação sexual podem ser classificados em relação a sua posição nesta cascata. Aqueles que atuam no início dela desencadeando todo o processo de diferenciação são denominados *upstream*, também conhecido como gene mestre e há genes localizados no decorrer cascata gênica, sendo conhecidos como genes *downstream* (Henning, 2007).

Dentre os diversos genes relacionados ao desenvolvimento sexual, um dos mais conservados na determinação do sexo em vertebrados é o fator de transcrição *DMRT1* (*doublesex/mab-3 related transcription fator-1*) responsável pela transcrição de proteínas com o domínio DM, com estrutura e função conservadas. O gene *DMRT1* foi descrito pela primeira vez nos reguladores sexuais de invertebrados, *doublesex* de *Drosophila* e *MAB-3* de *Caenorhabditis elegans* e estão relacionadas ao desenvolvimento sexual de

machos em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (Guan *et al.*, 2000; Devlin & Nagahama, 2002; Matsuda *et al.*, 2002; Liu, 2004; Tevosian, 2013).

Em todos os vertebrados analisados, o *DMRT1/dmrt1* parece ter um perfil de expressão sexo-específico nas gônadas de machos durante a embriogênese e o desenvolvimento larval. Uma cópia duplicada do gene autossômico *dmrt1*, o gene *DMY/dmrt1bY*, foi encontrada no cromossomo Y de *Oryzias latipes* (Medaka) – espécie com o sistema XX/XY de determinação do sexo, ou macho heterogamético – e é considerada equivalente em ação, ao gene *SRY*, relacionado à determinação sexual de machos nos mamíferos sendo gene mestre (*upstream*) nesta espécie (Sinclair *et al.*, 1990). Apesar de pertencer à família de proteínas com o domínio HMG-box, o gene *SRY* assemelha-se ao *dmrt1* por codificar uma proteína que regula a transcrição gênica, sendo ambos, fatores de transcrição (Wetering *et al.*, 1993; Graves, 1995; Guan *et al.*, 2000; Bratus & Slota, 2006).

Estudos realizados em várias espécies de peixes teleósteos demonstraram uma função conservada do gene *dmrt1* (*DMY/dmrt1bY* em *Oryzias latipes*) durante a diferenciação sexual em machos (Guan *et al.*, 2000; Marchand *et al.*, 2000; Devlin & Nagahama, 2002; Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002). O papel do *DMY/dmrt1bY* nesta espécie foi analisado por meio de mutações que afetam esse gene em indivíduos XY. Essas mutações levam à expressão reduzida de *mRNA* do gene e à produção de proteínas truncadas, resultando em indivíduos com fenótipo feminino (Matsuda *et al.*, 2002).

Em *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) por sua vez, a expressão do gene *dmrt1* durante a diferenciação gonadal mostrou-se maior em machos, em relação às fêmeas (Marchand *et al.*, 2000). Resultado semelhante foi observado em estudo realizado com *Oreochromis niloticus* e o *Odontesthes bonariensis* (Peixe-rei) (Guan *et al.*, 2000; Fernandino *et al.*, 2008a).

Trabalhos realizados em outros vertebrados reforçam a importância de *DMRT1* na diferenciação gonadal em machos em diversas classes. Em aves e em anfíbios, que possuem sistema cromossômico semelhante ao apresentado pelo gênero *Characidium* – gênero alvo do presente estudo -ZZ/ZW, foi demonstrado que o gene *DMRT1/dmrt1* está relacionado ao desenvolvimento do sexo masculino (Yoshimoto *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009).

Outro importante e conhecido gene ligado ao desenvolvimento sexual em vertebrados é o que codifica o hormônio anti-Mülleriano (AMH). Trata-se de uma glicoproteína pertencente à família de fator de crescimento TGF- β , com importante função no desenvolvimento genital de vertebrados e responsável pela regressão dos ductos Müllerianos em embriões de machos, estruturas que persistem durante a diferenciação sexual das fêmeas.

Os peixes teleósteos não possuem ductos Müllerianos, porém genes homólogos ao que codifica o hormônio AMH (*amh*) nos demais vertebrados foram encontrados em algumas espécies de peixes teleósteos, como *Oryzias latipes*, *Danio rerio* (peixe-zebra), peixe rei e *Squalius alburnoides* (bordalo) (Kluver *et al.*, 2007; Rodríguez-Mari *et al.*, 2005; Fernandino *et al.*, 2008b; Pala *et al.*, 2008). Estudos envolvendo espécies modelo como o *Oryzias Latipes* e o *Danio rerio* demonstram que a expressão deste gene é maior em gônadas de machos comparada à sua expressão nas fêmeas, durante a diferenciação do sexo nestas espécies. Em *Squalius alburnoides* e *Odontesthes bonariensis*, os resultados apontam para uma conservação da função do gene *amh* no início do desenvolvimento sexual de machos (Pala *et al.*, 2008, Fernandino *et al.* 2008b).

Estudos recentes têm mostrado que genes pertencentes à família TGF- β , como é o caso do gene *amh*, podem passar a ter função de gene mestre (*upstream*) na diferenciação gonadal em alguns teleósteos, sugerindo um mecanismo alternativo de diferenciação das gônadas não dependente de fatores de transcrição (Kikuchi & Hamaguchi, 2013).

Na espécie *Odontesthes hatcheri* (peixe-rei patagônico), por exemplo, Hattori e colaboradores (2012) identificaram a existência de uma cópia duplicada do gene *amh* no cromossomo Y de machos, podendo ser então considerado um forte candidato a gene mestre na diferenciação sexual de machos nesta espécie.

Já Myosho e colaboradores (2012), identificaram outro gene, o *gsdfY* como um forte candidato a gene mestre de diferenciação gonadal nas espécies pertencentes ao mesmo gênero de *Oryzias latipes*: *Orizias luzonensis* e *Orizias curvinotus*. Este gene foi identificado no cromossomo Y e é responsável por codificar uma proteína secretora pertencente também à família TGF- β , à mesma a qual pertence o hormônio anti-Müllerianos (AMH). Neste mesmo estudo demonstraram que a presença de um alelo localizado no cromossomo Y foi suficiente para reverter o sexo de fêmeas para machos em 94% das fêmeas genéticas (aquelas que apresentam os cromossomos XX).

Kamiya e colaboradores (2012) observaram a relação de um gene que codifica o receptor de AMH, o gene *amhr2*, à diferenciação sexual em *Takifugu rubripes* (fugu). Os autores observaram que um SNP (*single nucleotide lenght polymorphism*) (C/G) no gene *amhr2*, polimórfico em machos, era responsável pela diferenciação gonadal e que mutações neste gene levaram a machos genéticos (XY) com características femininas nesta espécie.

Nesses três estudos três novos genes relacionados à diferenciação do sexo, que atuam por meio da via de sinalização de TGF- β . Até recentemente (2011) todos os genes principais ligados à determinação sexual conhecidos nos vertebrados eram conhecidamente fatores de transcrição, como no caso de *dmrt1* e *Sry* (Kikuchi & Hamaguchi, 2013).

Outro importante gene para a diferenciação do sexo é o *cyp19a1a*, que codifica para a aromatase gonadal (P450 aromatase). Esta enzima é expressa nas células granulosas e

possui um papel fundamental na diferenciação e desenvolvimento dos ovários em vertebrados, através da conversão de testosterona em estradiol.

A expressão do gene para aromatase gonadal (*cyp19a1a*) foi identificada em algumas das espécies de peixes citadas acima, (*Oreochromis niloticus*, *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio*, *Odontesthes hatcheri* e também em *Perca flavescens*) (D’Cotta *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2008; Gohin *et al.*, 2011; Wang & Orban, 2007; Fernandino *et al.*, 2008 a e b; Uno, 2012), onde a expressão também se apresentou maior em fêmeas durante a diferenciação sexual em comparação com machos, confirmando a importância do gene no desenvolvimento sexual de fêmeas. Em *Danio rerio* também foi possível observar, por meio de PCR em tempo real, relação entre as expressões dos genes *cyp19a1a* e *amh*, em que o nível de expressão do gene *amh* decaía em relação ao nível de expressão de *cyp19a1a*, confirmando efeitos contrários destes dois genes durante o desenvolvimento sexual em peixes teleósteos (Wang & Orban, 2007).

Wu e colaboradores (2008) avaliaram peixes hermafroditas como a espécie *Acanthopagrus schlegeli*, detectando níveis altos de expressão do gene *cyp19a1a* durante o desenvolvimento de machos, no momento em que as gônadas ainda estão indiferenciadas. Neste trabalho, o gene *cyp19a1a* apresentou baixos níveis de expressão, quando as gônadas se encontram já diferenciadas, enquanto a expressão e transcrição aumentaram conforme ocorreu o desenvolvimento das gônadas em fêmeas desta espécie.

1.50 gênero alvo: *Characidium*

Os Brasil assim como os demais países da América do Sul e da América Central formam o que conhecemos como região biogeográfica Neotropical, considerada a mais rica em espécies de peixes de água doce, compreendendo por volta de 4035 espécies de

peixes em um total de aproximadamente 705 gêneros conhecidos e descritos (Lévêque *et al.*, 2008).

Entre os teleósteos, a ordem Characiformes, que é constituída de cerca de 270 gêneros e pelo menos 1674 espécies, grande parte delas está distribuída na região Neotropical, entre o sul dos Estados Unidos e sul da América do Sul (Nelson, 2006). Entre os gêneros com ampla distribuição na ordem Characiformes, o *Characidium* é o mais rico em número de espécies dentro da subfamília Characidiinae (Chrenuchidae), constituída por um total de nove gêneros, com cerca de 50 espécies já descritas, ocorrendo desde o Panamá até a Argentina (Buckup, 2003).

Estudos genéticos disponíveis para o gênero *Characidium*, apesar de escassos restringindo-se a apenas algumas espécies, têm demonstrado um padrão relativamente estável em relação ao número diploide ($2n$), sendo que todas as espécies que têm suas características citogenéticas descritas em estudos apresentam $2n=50$ cromossomos de dois braços, caracterizados por cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos.

Há poucas variações cariotípicas entre as espécies de *Characidium*, sendo as principais, a presença de cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ/ZW, e a presença de cromossomos supranuméricos, ou comumente denominados, cromossomos B em algumas espécies (Centofane *et al.*, 2001; Centofane *et al.*, 2003; Vicari *et al.*, 2008; Noleto *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010).

O sistema cromossômico do gênero caracteriza-se pela presença de um cromossomo Z metacêntrico com blocos heterocromáticos intersticiais e/ou terminais e por um cromossomo W totalmente heterocromático, com variações interespecíficas. Além dos blocos heterocromáticos, é observada ainda uma variação em relação à presença das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) que podem ser observadas nos cromossomos sexuais como ocorre nas espécies *Characidium pterostictum*, *Characidium lauroi* e *Characidium schubarti* (mocinha) (Alves *et al.*, 2010).

As peculiaridades apresentadas pelos cromossomos Z e W no gênero *Characidium* indicam que esses cromossomos passaram por distintos processos de diferenciação ao longo de seu processo evolutivo (Alves, 2010, Vicari *et al.*, 2008).

Segundo Alves (2010), levando em consideração os eventos cromossômicos envolvendo a heterocromatina constitutiva que levam às variações fenotípicas apresentadas pelas espécies, o gênero pode ser dividido em dois grupos principais; o primeiro possui a heterocromatina pericentromérica e /ou telomérica e ausência de diferenciação sexual dos cromossomos. Este grupo é formado por espécies que se distribuem principalmente pela Bacia do Tiête; no segundo grupo, a heterocromatina se encontra em posição pericentromérica, telomericamente e ainda no sistema cromossômico ZW/ZZ, sendo a heterocromatização parcial ou total do cromossomo W observada. Este grupo caracteriza-se por espécies distribuídas na Bacia do Rio Paranapanema.

Ainda há a presença de Ag-RONs em cromossomos sexuais de algumas espécies como *Characidium schubarti*, sendo esta segundo Alves (2010), anterior aos processos que levaram à formação dos cromossomos sexuais diferenciados Z e W. Desse modo, RONs, ao menos neste gênero, podem não ter relação com a determinação do sexo, constituindo apenas importantes marcadores em estudos citogenéticos e de diferenciação e origem de cromossomos sexuais.

Objetivos

O presente estudo tem como objetivo geral o estudo da biologia reprodutiva da espécie *Characidium schubarti* (Characiformes), à luz de duas principais abordagens: genética e fisiológica/ambiental da reprodução.

Sendo os objetivos mais específicos:

- A identificação da expressão de 3 dos principais genes relacionados a diferenciação das gônadas - *dmrt1*, *amh* e *cyp19a1a* – e a observação de padrões filogenéticos relacionados aos genes em teleósteos, compreendendo a análise da similaridade entre as moléculas em ordens distintas a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos e construção de árvore filogenética.
- A descrição de condições para criação da espécie em cativeiro e os efeitos do uso de hormônios exógenos e de variáveis ambientais, no desenvolvimento reprodutivo de indivíduos machos e fêmeas da espécie *Characidium schubarti*. A partir da criação de indivíduos em aquários e injeção de hormônios exógenos, como extrato hipofisário de carpa.

Além disso, este trabalho é parte de um projeto que pretende iniciar o estudo de genes relacionados à diferenciação sexual no grupo de pesquisa do Laboratório de Ictiogenética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

CAPÍTULO 1. Identificação de genes relacionados à diferenciação sexual em espécie de teleósteo Neotropical, *Characidium schubarti* (Characiformes).

1.1 Abstract

Teleost fishes represent about 50% of all vertebrates over the world, such a variety is also noticed in the different forms of sexual determination which are triggered by differences in the temperature and genetics. Concerning the latter, some genes such as *dmrt1*, *amh* e *cyp19a1a* known in other species were identified in teleost fishes. Furthermore, genes *dmrt1* e *amh* have an important role in male differentiation whereas gene *cyp19a1a* is related to female differentiation. Studies concerning genes as the mainstream in the sexual differentiation in species of teleost are becoming frequent in the literature. However, this is not the case for Characiformes order. The aim of this work is to identify the above genes in the species of *Characidium schubarti*, identifying the sequences related to these genes. By characterizing fragments of genes *dmrt1* and *cyp19a1a* in *Characidium schubarti* and to observe the similarities among the target species and other species of teleost from trees and using NJ method, the obtained phylogenetic analysis was similar to the found relation for morphologic data of teleost fishes.

1.2 Resumo

Os peixes teleósteos representam cerca de 50% do total das espécies de vertebradas já descritas no mundo; esta grande variedade reflete-se nas diferentes formas de determinação sexual, sendo as principais desencadeadas por diferenças na temperatura e por fatores genéticos. Em relação aos genes envolvidos neste mecanismo, alguns já conhecidos em outras espécies de vertebrados têm sido identificados em espécies de teleósteos, como é o caso dos genes *dmrt1*, *amh* e *cyp19a1a*. Os genes *dmrt1* e *amh* têm importante papel na diferenciação em machos de teleósteos e o gene *cyp19a1a* por sua vez, possui relação com a diferenciação sexual de fêmeas. Têm sido cada vez mais presente na literatura estudos envolvendo genes da via de diferenciação sexual em espécies de teleósteos, porém em relação à ordem Characiformes não foram encontradas na literatura descrições. O presente trabalho tem como objetivo principal a identificação dos genes acima citados na espécie *Characidium schubarti*. Foi possível, caracterizar fragmentos dos genes *dmrt1* e *cyp19a1a* em *Characidium schubarti* e através desses observar similaridade entre a espécie alvo e outras representantes dos peixes teleósteos a partir de árvores usando o método NJ, as análises filogenéticas obtidas foram semelhantes às relações obtidas para dados morfológicos do grupo teleósteo.

1.3 Introdução

As espécies de peixes teleósteos representam aproximadamente metade dos vertebrados existentes já classificados e apresentam grande variedade de mecanismos de determinação do sexo. Essa determinação pode ser desencadeada por fatores ambientais, fatores genéticos e, em algumas espécies, ambos podem ser observados atuando conjuntamente (Kikuchi & Hamaguchi, 2013). Apesar de sua importância na determinação do sexo em teleósteos, os fatores ambientais não serão abordados neste estudo.

Quanto aos fatores genéticos, a determinação pode ser dividida em dois diferentes sistemas. O primeiro, denominado sistema monofatorial, envolve um gene principal, o qual desencadeia a via responsável pelo desenvolvimento sexual, em espécies com esse sistema há ainda a presença de cromossomos sexuais diferenciados. O outro é denominado sistema polifatorial e ocorre quando muitos genes presentes em múltiplos cromossomos autossômicos são responsáveis pela determinação do sexo (Sandra & Norma, 2010; Kikuchi & Hamaguchi, 2013).

Os genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo são caracterizados segundo sua localização na via de desenvolvimento sexual, classificados como *upstream* ou *downstream*. O gene *upstream*, ou mestre, está localizado em cromossomos sexuais e atua no topo da uma via bioquímica, sendo responsável por desencadeá-la. Os genes conhecidos como *downstream* atuam no decorrer desta via e estão localizados em cromossomos autossomos.

Genes envolvidos na determinação e diferenciação sexual têm sido descritos em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e também em teleósteos. Entretanto, pouco é conhecido

sobre sua conservação funcional, e ainda não está claro se há um conjunto comum de genes compartilhados por todos os vertebrados (Farconi *et al.*, 2013).

O gene *downstream* mais conservado dentre os vertebrados, e também dentre os teleósteos, é o *dmrt1*, um fator de transcrição relacionado à proteína com domínio DM, semelhante à proteína “dedo de zinco” (*zinc finger*), que possui propriedade de se ligar à molécula de DNA controlando sua transcrição. Este gene é descrito como responsável pelo desenvolvimento dos testículos em todos os vertebrados (Devlin & Nagahama, 2002; Guo *et al.*, 2005).

O gene *dmrt1* já foi descrito para algumas espécies de teleósteos, como em *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) *Odontesthes bonariensis* (peixe-rei), *Silurus meridionalis* e *Anoplopoma fimbria* (peixe-carvão) nas quais sua expressão apresentou-se maior em tecidos gonadais de machos em relação às gônadas de fêmeas, confirmando seu importante papel no desenvolvimento sexual masculino também em teleósteos (Marchand *et al.*, 2000; Guan *et al.*, 2000; Fernandino *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2013).

Em *Oryzias latipes* (medaka), uma cópia duplicada deste gene foi descrita como gene mestre (*upstream*), já que está inserido no cromossomo Y de machos heterogaméticos (XY) da espécie. Neste caso, o gene gerado pela duplicação (*DMY/dmrt1bY*) é considerado equivalente em função ao gene *SRY*, mestre em espécies de mamíferos placentários, onde também está localizado no cromossomo Y destes animais (Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002).

Outro gene considerado importante no desenvolvimento sexual de machos em vertebrados é o *amh* (hormônio anti-müllerianos), uma glicoproteína integrante da família do fator de crescimento TGF- β , responsável pela regressão dos ductos Müllerianos (estruturas características de gônadas femininas) e, portanto, importante no desenvolvimento de machos.

Em teleósteos, a função deste hormônio permanece não completamente esclarecida devido à ausência de ductos Müllerianos nos indivíduos do grupo, porém, foi descoberta a expressão do gene *amh* em algumas espécies de peixes teleósteos nos tecidos gonadais de machos, durante a diferenciação em algumas espécies como *Carassius auratus* (peixe vermelho), *Danio rerio* (peixe zebra), *Oryzias latipes*, *Paralichthys olivaceus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus*, *Dicentrarchus labrax* (robalo), *Squalius alburnoides* (bordalo) e *Odontesthes ratcheri* (peixe-rei patagônico) (Miura *et al.*, 2002; Yoshinaga *et al.*, 2004; Halm *et al.*, 2007; Kluver *et al.*, 2007; Fernandino *et al.*, 2008b; Pala *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013).

Recentemente, alguns estudos apresentaram genes relacionados à diferenciação do sexo em teleósteos, considerados então até o momento apenas como sendo *downstream* a via de diferenciação como fortes candidatos a genes mestres na determinação sexual de teleósteos (Hattori *et al.*, 2012; Myosho *et al.*, 2012; Kikuchi & Hamaguchi, 2013).

Em Hattori e colaboradores (2012), descreve-se uma cópia de *amh* no cromossomo Y de *Odontesthes ratcheri*, denominado como *amhy*, esta tem sido considerada um forte candidato a gene mestre nesta espécie. Outro candidato a gene mestre foi sugerido em outras espécies de teleósteos. Em estudo de Myosho e colaboradores (2012), os autores identificaram em cromossomos Y de machos das espécies *Oryzias Luzonensis* e *Oryzias curvinotus*, o gene *gsdfY*, que assim como o gene *amh* é representante da família TGF- β e é outro gene candidato a gene mestre em teleósteos.

Estas novas descobertas estão de acordo com a proposta por Wilkin (1995), que argumenta que genes localizados em posição *downstream* em uma via, como a cascata genética da determinação e diferenciação sexual podem ser recrutados para o topo da via, passando a atuar como genes *upstream*.

Já em relação ao desenvolvimento sexual nas fêmeas, o gene *cyp19a1a*, relacionado à aromatase gonadal (P450 aromatase), foi descrito para algumas espécies de teleósteos

D'Cotta *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2008; Gohin *et al.*, 2011; Wang & Orban, 2007; Fernandino *et al.*, 2008 a e b; Uno, 2012). A aromatase P450 é uma enzima que tem papel fundamental na fisiologia sexual de fêmeas, pois é ela a responsável pela conversão de testosterona em estradiol, por meio da aromatização da molécula de testosterona.

O gene *cyp19a1a* tem sua expressão gênica maior em gônadas de fêmeas em relação à expressão observada em gônadas de machos, em todas as espécies estudadas, demonstrando, portanto, sua importância na diferenciação sexual de fêmeas.

A expressão deste gene foi verificada em espécies como *Silurus meridionalis*, e outras já citadas anteriormente (*Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus*, *Odontesthes bonariensis*, *Anoplopoma fimbria*) além de estar presente em algumas espécies de ciclídeos (D'Cotta *et al.*, 2001; Fernandino *et al.*, 2008 a e b; Park *et al.*, 2008; Gohin *et al.*, 2011; Böhne *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013).

Estudos mostram, ainda, a relação entre os três genes citados (*dmrt1*, *amh* e *cyp19a1a*). Tanto o gene *amh* quanto o *dmrt1* produzem proteínas que podem regular negativamente a expressão do gene *cyp19a1a* em gônadas de teleósteos machos, controlando assim a diferenciação gonadal (Rouiller-Fabre *et al.*, 1998; Böhne *et al.*, 2013; Poonlaphdecha *et al.*, 2013).

Como visto, há um número crescente de estudos caracterizando genes relacionados à determinação e diferenciação sexual em teleósteos. Neste grupo, a ordem Characiformes é uma das ordens que apresentam um grande número de espécies e diversidade (1674 espécies descritas), sendo exclusivamente de ambiente de água doce e em sua grande maioria representantes da região Neotropical (Nelson, 2006).

Apesar da grande riqueza apresentada, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação do sexo em espécies da ordem Characiformes. Dentre os diversos trabalhos que se propõem a identificação de genes relacionados à

diferenciação e determinação do sexo em teleósteos, não foi encontrada bibliografia que utilizassem espécies pertencentes à ordem Characiformes como modelo de estudo.

1.4 Objetivos

O presente capítulo tem como objetivo principal, a identificação de três genes relacionados à diferenciação sexual em peixes teleósteos, na espécie *Characidium schubarti*, também conhecido como mocinha, representante Neotropical da ordem Characiformes. Os genes alvos deste estudo são *dmrt1* e *amh*, envolvidos na diferenciação gonadal masculina e *cyp19a1a*, envolvido na diferenciação gonadal feminina.

Um objetivo secundário é a observação da similaridade dos genes identificados para *Characidium schubarti* com outras espécies de teleósteos, o que permite inferir sobre a utilização dos mesmos em estudos de grupos relacionados.

1.5 Metodologia

1.5.1 Coletas e obtenção dos exemplares

As coletas dos exemplares foram realizadas em uma das principais bacias da região sudeste do Brasil a bacia do Rio Paranapanema, sendo o rio Taquaral (São Miguel Arcanjo, SP), com coordenadas geográficas S 24° 02' 803'' W 48°01'716'' e o rio Invernadinha, S 24° 12. 067' W 49° 37. 657', localizado na cidade de Jaguariaíva no estado do Paraná.

Figura 1: Locais de coleta: São Miguel Arcanjo, São Paulo e Jaguariaíva, Paraná; bacia do Paranapanema.

1.5.2 Identificação dos espécimes coletados

Apesar de ser considerado o gênero mais amplamente distribuído e rico da família Chrenuchidae, com alta representatividade nas coletas de museus, o gênero *Characidium* é considerado pouco conhecido, incluindo vários táxons ainda em processo de descrição (Buckup, 1993) e a maioria das identificações requer ainda consulta às descrições originais (Melo, 2001). Por isso, para identificação dos exemplares coletados foi usada a amplificação do gene Citocromo Oxidase I (COI), o qual se mostrou eficaz para a identificação das diferenciação de indivíduos das espécies *Characidium*, conforme estudos presentes na literatura (Pereira *et al.* 2010).

Os 25 µl da reação de PCR para amplificação da região COI consistiram em 3mM de MgCl₂(50mM), 10mM de cada *primer* VF1 e VR1 (Pereira *et al.*, 2010), 1x de tampão de PCR (10x), 2mM de dNTP, 0,5 µl de *Taq* polimerase (1U) e 1,0 µl de DNA (aproximadamente 200ng/ µl).

As condições do ciclo para a reação seguiram Pereira e colaboradores (2010), com desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos compostos por desnaturação a 96°C por 45 segundos, hibridação a 50°C por 60 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

O produto de PCR é submetido à reação de sequenciamento utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) e precipitado de acordo com instruções do fabricante, por fim, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética nos sequenciadores automáticos ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyzer* no Instituto de Química, da Universidade de São Paulo.

As análises foram editadas/analizadas com uso do programa *BioEdit 7.2.3* (Hall, 1999) e comparadas com dados já publicados sobre o gênero no banco de dados FISH-BOL (*The Fish Barcode of life Initiative*: www.fishbol.org).

Parte dos espécimes coletados foi levada ao Museu Nacional do Rio de Janeiro para serem identificados pelo taxonomista especialista em sistemática das espécies do gênero *Characidium*, Prof. Dr. Paulo A. Buckup, o qual utilizou caracteres morfológicos e/ou morfométricos. Estes espécimes estão conservados na coleção do Museu Nacional do Rio de Janeiro com os números de registro MNRJ39640 para exemplares do rio Taquaral e MNRJ39641 para exemplares do rio Invernadinha. O restante dos espécimes coletados foi conservado em álcool 96% na coleção do laboratório de Ictiogenética no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

1.5.3 Extração do RNA total e síntese de cDNA fita dupla

O RNA total foi extraído de gônadas de indivíduos adultos conservadas em RNAlater® (Quiagen), mantendo o RNA íntegro. As extrações foram realizadas, a princípio, usando-se TRIzol® Reagent (Invitrogen), seguido pelo protocolo sem uso de kit e posteriormente com uso de mini RNeasy® *Lipid Tissue mini kit* (Quiagen), que apresentou melhores resultados; ambos protocolos foram realizados a partir da maceração de porções do tecido gonadal.

A integridade do material obtido da extração, foi averiguada por eletroforese em gel de agarose e quantificação com uso de NanodropTM Spectrophotometer (ND-100), sendo utilizadas nas etapas seguintes apenas amostras com razão Abs260/Abs280nm acima de 1.8.

A síntese de cDNA foi antecedida de um tratamento de *DNAse* para completa remoção de DNA da amostra; em seguida, a cadeia de DNA complementar ao mRNA (cDNA) foi sintetizada com uso da enzima Super ScriptTM® III RT (Invitrogen) com primers Oligo (dT)15, seguindo protocolo do fabricante.

1.5.4 Desenho de *primers*

Para o desenho dos *primers* foi utilizado o software *Primer3* (Rozen *et al.*, 1999) primariamente a partir de sequências de *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes), disponíveis no banco de dados *GenBank*. O número de acesso das sequências usadas para é AY763406 para o gene *amh*, AY319416, para o gene *dmrt1*, EF030342 e para o gene *cyp19a1a* (ver tabela 1) (Fernandino *et al.*, 2003; Karube *et al.* (não publicado); Fernandino *et al.*, 2008b).

Foram desenhados também pares de *primers* com sequências de outras espécies: para o gene *amh* a sequência usada foi descrito para *Danio rerio* (Zebrafish) (Cypriniformes) com número de acesso NM_001007779.1, e para o gene *cyp19a1a* desenho baseou-se nas sequências descritas para o gênero de Carpa *Cyprinus* (Cypriniformes) com número de acesso KC147010.1 e também da espécie *Silurus meridionalis* (Siluriformes) com número de acesso AY325908.1 (ver tabela 1) (Wang *et al.* (não publicado); Chen *et al.*, 2013 a; Zhang & Liu (não publicado)).

Tabela 1: lista de *primers* desenhados e testados para os 3 genes alvos; espécies a qual pertencem as sequências bases para os desenhos.

Primer	Sequência	Origem
Dmrt1 dgRV1	5'TGCTGGTAGTTGTAVARGTTSCYR3'	<i>O. bonariensis</i>
Dmrt1dgFW1	5'RYCYCCGSGGATGCCCAART3'	<i>O. bonariensis</i>
DMRT1FW	5'CCAAATGCTCCCGCTGCAGG3'	<i>O. bonariensis</i>
RT-dgAmhFW2	5'AGAGCCACRGAGAGGCTRGGA3'	<i>O. bonariensis</i>
RT-dgAmhRV2	5'TGAGCTTGAGCAGGACGGRTGGTT3'	<i>O. bonariensis</i>
obmisFW(amh)	5'CCTGGCACTCGGCTTATCCTCC3'	<i>O. bonarensis</i>
OPJF (cyp19a)	5'ATCCCCACGGCAATGCGAACC3'	<i>O. bonarensis</i>
OVPJR3 (cyp19a)	5'ATGCCCCGCTGAGTATGAAGGTCT3'	<i>O. bonarensis</i>
cyp19a1a-dgRV1	5'CYCTSACRTYCTCWGCHSWCAR3'	<i>O. bonarensis</i>
Cyp19a1adgFW1	5'TCCKYBYTTYTKYCTGGGHBTTGG3'	<i>O. bonarensis</i>
Dn582F (amh)	5'ACGTTTCCTGAATTGTCACCG3'	<i>D. rerio</i>
Dn881R (amh)	5'TGAGGCAGGATGTCCCTTAA3'	<i>D. rerio</i>
Dn83F (amh)	5'AGCAGGACAACAACCCGAAC3'	<i>D. rerio</i>
Dn382R (amh)	5'TAGCATGCACACCCTTGAGG3'	<i>D. rerio</i>
Dn 932F (amh)	5'CGTTGCATTCTCTTCCACCT3'	<i>D. rerio</i>
Dn1-231R(amh)	5'TAGCTGCTTCACTGTCTCT3'	<i>D. rerio</i>
Dn1-228F(amh)	5'ATGGTGCTCAGTAACTGGGA3'	<i>D. rerio</i>
Dn1-587(amh)	5'CTCCAGCTCAATCACACACA3'	<i>D. rerio</i>
Cy352F(cyp19a)	5'CATTGTGCGGGTCTGGATCCA3'	<i>Cyprinus</i>
Cy1-315R(cyp19a)	5'TTCGGATCTGTGCATCCGAC3'	<i>Cyprinus</i>
Cy353F(cyp19a)	5'ATTGTGCGGGTCTGGATCAA3'	<i>Cyprinus</i>
Cy652R(cyp19a)	5'TCCCTGAGCATCTGTCAGGT3'	<i>Cyprinus</i>
Cy849F(cyp19a)	5'CAGGAGTTGCAGGATGCCAT3'	<i>Cyprinus</i>
Cy1-147R(cyp19a)	5'ATGTGAGTGCTGCAGACTCC3'	<i>Cyprinus</i>
Sm285F(cyp19a)	5'GGGTCCCCTGATGTCCTACT3'	<i>S. meridionalis</i>
Sm584R(cyp19a)	5'CCTGGACCGGTTAGAGCTT3'	<i>S. meridionalis</i>
Sm690F(cyp19a)	5'GCGCTGCATCGTAGTGGATA3'	<i>S. meridionalis</i>
Sm989R(cyp19a)	5'GTCAGCTCACCGTGA CTCTG3'	<i>S. meridionalis</i>
MisFish FW(amh)	5' CTCCCTGCAGTCSCTSCCYC 3'	<i>O. bonariensis</i>
MisFish RV (amh)	5' CAGSAYGGCGTGGTTGKTGG 3'	<i>O. bonariensis</i>

1.5.5 RT-PCR para amplificação dos fragmentos de cDNA

Ao cDNA obtido foi aplicada a técnica de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) amplamente utilizada para verificar a presença de expressão do gene no órgão alvo.

Para cada reação de amplificação de fragmentos relacionados aos três genes de estudo foram utilizados os seguintes reagentes kit TakaRa Taq HS *hot start* (Clontech®) com volume final de 25µl tendo como concentrações 250 U de Taq, 10x PCR buffer (contendo 15mMMgCl₂), 2,5 mM de cada dNTP e *primers forward* e *reverse* em concentração de 10mM.

Foi usado também o kit Phusion High Fidelity DNA polymerase (Termo Scientific) com 0,02U/µl de polimerase, 1x Phusion HF Buffer (5x), e 10 mM de cada primer (*forward* e *reverse*), completando com água MILIQ para um volume final de 25µl.

O cDNA usado em todas as reações como modelo teve concentração de 100 a 250ng/µl.

As reações foram submetidas ao seguinte programa: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de hibridação de 60°C por 3 minutos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e uma elongação final a 72°C por 3 minutos e foi realizado em Termociclador *Eppendorf (mastercycle)*.

Foram testados diferentes temperaturas de hibridação para todos os pares testados, em gradiente (52°C, 55°C, 57°C, 60°C e 63°C) e 60°C foi a temperatura ideal para todas as amplificações.

O produto de reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1x e corado com brometo de etídio e por fim, os fragmentos observados em gel foram foto documentados com auxílio de luz ultravioleta.

Alguns fragmentos obtidos em forma de bandas no gel, foram retirados com auxílio de uma espátula e purificados com uso do kit *QIAquick Gel Extration* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

O produto de cada RT-PCR foi purificado em reação contendo 2,5 de enzima *FastAP* (Fermentas) (1U) e 10µl do produto de PCR, que foram submetidas a 37°C por 30 minutos e 80°C por 15 minutos em termociclador *Eppendorf (mastercycle)*. O sequenciamento foi realizado da mesma forma como descrito acima, para as sequências do *COI*.

1.5.6 Análise dos dados

O BLAST (*Basic Local Alignment Search tool*) do banco de dados *GenBank* foi utilizado para confirmação da correta amplificação dos genes alvo, por meio dos algoritmos *discontiguous megablast* (sequências mais similares) e *megablast* (sequências muito similares).

O alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foi realizado com o ClustalW em MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), e foi editado no *BioEdit* 7.2.3 (Hall, 1999). Todas as sequências de nucleotídeos utilizadas, exceto a de *Chararcidium schubarti*, foram obtidas do banco de dados do *GenBank* (NCBI) e estão expostas nas tabelas 2 e 3; o alinhamento obtido foi obtido pelo programa.

A tradução e a análise filogenética foi realizada pelo programa MEGA 5, o melhor modelo de substituição de aminoácidos foi obtido pelo programa ProTest 2.4, sendo encontrado com modelo mais adequado o Jones Taylor-Thornton (JTT+F) (Jones *et al.*, 1992; Abascal *et al.*, 2005).

O método usado para a construção das árvores filogenéticas foi o Neighbor-Joining (NJ), com 1000 simulações de *bootstrap* para ambos os gene

Tabela 2: Sequências usadas para análise filogenética do gene *dmrt1*.

Ordem	Espécie	Número de acesso	Referência
Siluriformes	<i>Silurius meridionalis</i>	EF015488	Liu <i>et al.</i> , 2007
Siluriformes	<i>Pelteobargus fulvidraco</i>	HM245921	Li <i>et al.</i> (não publicado)
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i>	AB127117.1	Kobayashi <i>et al.</i> , 2003
Cypriniformes	<i>Squalius pyrenaicus</i>	EU199439.1	Pala <i>et al.</i> , 2008
Beloniformes	<i>Oryzias latipes</i>	AF319994	Brunner <i>et al.</i> , 2001
Salmoniformes	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AF209095	Marchand <i>et al.</i> , 2000
Perciformes	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AM993096.1	Deloffre <i>et al.</i> , 2009
Atheriniformes	<i>Odontesthes boanriensis</i>	AY319416	Fernandino <i>et al.</i> , 2003
Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i>	NM_001037949	Brunner <i>et al.</i> , 2001
Synbranchiformes	<i>Monopterus albus</i>	AF421347	Huang <i>et al.</i> , 2005
Acipenseriformes	<i>Acipenser transmontanus</i>	AY057061.1	Vergara <i>et al.</i> (não publicado)

Tabela 3: Sequências usadas para análise filogenética do gene *cyp19a1a*.

Ordem	Espécie	Número de acesso	Referência
Siluriformes	<i>Ictalus punctatus</i>	S75715.1	Trant, 1994
Siluriformes	<i>Silurus meridionalis</i>	AY325908.1	Wang <i>et al.</i> (não publicado)
Siluriformes	<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	AY871802.1	Xu <i>et al.</i> (não publicado)
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i>	AF183906.1	Chiang <i>et al.</i> (não publicado)
Cypriniformes	<i>Cyprinus carpio</i>	DQ534411.1	Massari <i>et al.</i> (não publicado)
Beloniformes	<i>Oryzias latipes</i>	NM_001278879.1	Ohtsuka <i>et al.</i> , 1999
Atheriniformes	<i>Odontesthes banariensis</i>	EF030342	Karube <i>et al.</i> (não publicado)
Perciformes	<i>Larimichthys crocea</i>	FJ800566.1	Zhou <i>et al.</i> (não publicado)
Perciformes	<i>Oreochromis niloticus</i>	NM_001279586.1	Chang <i>et al.</i> , 1997
Gasterosteiformes	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	FJ773242.1	Yan <i>et al.</i> (não publicado)

1.6 Resultados

1.6.1 Identificação do gene *dmrt1* em *Characidium schubarti*

Após o teste de diferentes combinações de *primers* desenvolvidos em *Odontesthes bonariensis* (Tabela 1), foi obtido um fragmento com *nested PCR*, utilizando os conjuntos Dmrt1dgFW1/Dmrt1dgRV1 na primeira reação de RT-PCR e Dmrt1FW/Dmrt1dgRV1 na segunda reação.

O fragmento isolado de *dmrt1* em *Characidium schubarti* se caracteriza por apresentar aproximadamente 407 pares de bases (Figura 2). E sua sequência proteica possui 135 aminoácidos.

Este fragmento, obteve 84% de identidade entre os nucleotídeos em comparação com a sequência descrita para *Pseudobagrus fulvidraco* (Siluriformes) e 74% em relação ao *dmrt1* de *Squalius pyrenaicus* (Cypriniformes), valores observados a partir do alinhamento por meio do algoritmo *megablast* com sequências depositadas no *GeneBank* (NCBI).

No alinhamento da sequência de aminoácidos obtida com outras 11 espécies de teleósteos, é possível observar que houve a amplificação de parte do domínio DM, o qual caracteriza o gene (Figura 3). O domínio DM no fragmento isolado de *Characidium schubarti* possui 49 aminoácidos dos 62 totais já descritos na literatura (Liu *et al.*, 2007). Os valores de identidade par a par para as sequências e para o trecho referente ao domínio DM são apresentados nas tabelas 4 A e B, respectivamente.

O alinhamento foi utilizado para gerar uma árvore filogenética de Neighbour Joining da proteína *dmrt1*, com *Acipenser transmontanus*, o esturjão, como grupo externo, já que

Chondrostei é basal na filogenia de Actinopterygii, sendo conhecidamente mais próximo aos teleósteos (Figura 4).

A árvore mostra similaridade entre a sequência proteica de *dmrt1* de *Characidium schubarti*, representante da ordem Characiformes e das espécies pertencentes à ordem Siluriformes.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
TTCGTTTCTCCGCTGAAGGGCCACAAACGCTTCTGTAAGTGGAGGGACTGTCAGTGTGAGAAGTGTAAGTTATAGCGGAGCGCCAGCGGGT

      110     120     130     140     150     160     170     180     190
CCCAGGTGGCTTTGCGACGTGAGCAGGCTCAGGAGGAGGAGATGGGCATCTGCACCCAGTGAACCTGTCTGGTACTGACATTGTGGTGAAA

      210     220     230     240     250     260     270     280     290
AAACAGTGATTATGTGTTTCCAGTGGGAAGTAGATCACCATCATCCAACACCCCTGGTTCTGCCCTTCCCCAAATGCTTCAGGGAGTCGCT

      310     320     330     340     350     360     370     380     390
TCCCAGAGCCCAACTTCCAGCAGGGGGCACTCTGAGGGCTCATCTGACCTGGTGGTTGATGCATCCTACTACAACCTTTTACCAGCCTTCCCG

      . . . . .
CCTACTA

```

Figura 2: Sequência nucleotídica do fragmento do gene *dmrt1* obtido para a espécie *Characidium schubarti*.

	10 20 30 40 50 60 70
<i>Characidium schubarti</i> (Characiformes)	FVSP LKGHRFCNWRDCQCKLIAERQVRMAAQVALRRQQAQEEEMGICTPVNLSGTDIVVRNEPNSD
<i>Anoplopoma fimbria</i> (Scopaeniformes)	Y. P. L. S. A. PEVM. AAA.
<i>Danio rerio</i> (Cypriniformes)	 R. S. I. S. TL. AVGE
<i>Monopterus albus</i> (Synbranchiformes)	Y. S. L. L. S. A. SPEVM. AGA.
<i>Odontesthes bonariensis</i> (Atheriniformes)	Y. P. L. S. A. PEVM. AGA.
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Salmoniformes)	Y. L. S. AT. SQEV. TG.
<i>Oryzias latipes</i> (Beloniformes)	 R. K. R. A. G. L. S. EAS. PEVT. TGA.
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i> (Siluriformes)	. DP. G.
<i>Plecoglossus altivelis</i> (Osmeriformes)	Y. N. SI. SSE. SG.
<i>Silurus meridionalis</i> (Siluriformes)	. S. P. M. K. GI.
<i>Squalius pyrenaicus</i> (Cypriniformes)	 R. S. S. TM. VVG.
<i>Takifugu rubripes</i> (Tetraodontiformes)	 L. V. L. S. P. AGMM. AGAE

	110 120 130 140
<i>Characidium schubarti</i> (Characiformes)	ALSQS??TSSRGHS-EGSSDLVVDASY??FYQP-SRY??AY
<i>Anoplopoma fimbria</i> (Scopaeniformes)	. . . P. . . LSVG. . . S. . . T-D. LLET. . . ?? ?? . . .
<i>Danio rerio</i> (Cypriniformes)	M. . . L. . . PAM. T-DCT. . . M. ??L. -TP. . . ??S.
<i>Monopterus albus</i> (Synbranchiformes)	. . . S. . . F. . . PSAGA. . . P. . . T- . . ET. . . LLET. . . ?? ??T.
<i>Odontesthes bonariensis</i> (Atheriniformes)	. . . S. . . S. . . PSAAA. . . A. . . T- LLET. . . ?? ??T.
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Salmoniformes)	G. . . AS. . . PTAF. Q. . . TD. . . TA. . . L. . . T. PT.
<i>Oryzias latipes</i> (Beloniformes)	. . . S. . . S. . . PSAAA. . . VYG- . . EA. LLET. . . ?? ??S.
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i> (Siluriformes)	S. PTAA. A. . . M. -T. . . ?? . .
<i>Plecoglossus altivelis</i> (Osmeriformes)	P. P. . . PSA. AQF- . . T. ?? . .
<i>Silurus meridionalis</i> (Siluriformes)	S. P. . . PTAA. HHP. . . ?? . .
<i>Squalius pyrenaicus</i> (Cypriniformes)	M. . . AL. . . SAV. N- . . . P. . . E. . M. ??L?-----
<i>Takifugu rubripes</i> (Tetraodontiformes)	VT. . . SRPLAGA. . . AAN-D. . Q. LLES. . F. . ??L. C.

Figura 3: Alinhamento de aminoácido do fragmento obtido para o gene *dmrt1* para *Characidium schubarti* com sequências de outros peixes teleósteos; indicado pela letra I o domínio DM.

Tabela 4: A. Valores de identidade em % entre sequência de *dmrt1* para *C. schubarti* e demais espécies de teleosteos; B. Valores de identidade em % entre sequências do domínio DM para *Characidium schubarti* e demais espécies de teleosteos. Em negrito, os maiores e menores valores obtidos.

A. Espécies (Ordem)	% ID	B. Espécies (Ordem)	% ID
<i>P. fulvidraco</i> (Siluriformes)	85%	<i>P. fulvidraco</i> (Siluriformes)	100%
<i>S. meridionalis</i> (Siluriformes)	82%	<i>S. meridionalis</i> (Siluriformes)	100%
<i>D. rerio</i> (Cypriniformes)	67%	<i>D. rerio</i> (Cypriniformes)	98%
<i>S. pyrenaicus</i> (Cypriniformes)	63%	<i>S. pyrenaicus</i> (Cypriniformes)	98%
<i>O. mykiss</i> (Salmoniformes)	66%	<i>O. mykiss</i> (Salmoniformes)	98%
<i>P. altivelis</i> (Osmeriformes)	73%	<i>P. altivelis</i> (Osmeriformes)	98%
<i>O. bonariensis</i> (Atheriniformes)	67%	<i>O. bonariensis</i> (Atheriniformes)	94%
<i>O. latipes</i> (Beloniformes)	59%	<i>O. latipes</i> (Beloniformes)	88%
<i>M. albus</i> (Synbranchiforme)	65%	<i>M. albus</i> (Synbranchiforme)	94%
<i>T. rubripes</i> (Tetraodontiformes)	58%	<i>T. rubripes</i> (Tetraodontiformes)	94%
<i>A. fimbria</i> (Scorpaeniformes)	69%	<i>A. fimbria</i> (Scorpaeniformes)	93%

Figura 4: Árvore filogenética do gene *dmrt1* pelo método Neighbour Joining. Os valores de *bootstrap* para 1000 simulações são indicados nos ramos.

1.6.1 Identificação do gene *cyp19a1a* em *Characidium schubarti*

Para o gene *cyp19a1a*, os fragmentos de DNA foram obtidos a partir do uso do par de *primers* (690F e 989R) desenhados a partir de *Silurus meridionalis* (Tabela 1).

O fragmento de DNA obtido do gene *cyp19a1a* (P450 aromatase gonadal) em *Characidium schubarti* apresenta 240 pares de bases e sua sequência proteica 80 aminoácidos (Figura 5). Apesar de pequeno, o fragmento apresentou, segundo o algoritmo *discontiguous megablast* de nucleotídeos, 84% de identidade com a sequência obtida para a espécie *Ictalus punctatus* (Siluriformes), 80% com *Silurus meridionalis* (Siluriformes) e 76% com *Danio rerio* (Cypriniformes).

O alinhamento obtido da sequência de aminoácidos do fragmento com as sequências conhecidas de outras 10 espécies de peixes teleósteos, apresenta poucas regiões conservadas entre as sequências (Figura 6).

Os dados também foram usados para gerar uma árvore filogenética para o trecho da proteína P450 aromatase gonadal (Figura 7). Devido à inexistência de sequências deste gene disponíveis para espécies basais de Actinopterygii, não houve o enraizamento da árvore.

Observando a árvore podemos notar a similaridade entre *Characidium schubarti*, da ordem Characiformes, e as outras espécies pertencentes à Otophysi (ordem Siluriformes e Cypriniformes), o que também é evidenciado pelos valores de identidade do alinhamento, sendo o valor mais alto observado entre *Characidium schubarti* e *Pseudobagrus fulvidraco* (82%) (Tabela 5).

```

      10      20      30      40      50      60      70
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CTGTTTCCTGGACGTTCTCTCAATGAACACAATCTTCTGTCCAAAATCCACAAGTATTTTGATACCTGGC

      110     120     130     140     150     160     170
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TCAGACTGAAGTGGCTGCACGAGAAACACAAAAGCGCTGCTCAGGAGCTTCAGGATGCCATTGAGGAGCT

      210     220     230     240
-----|-----|-----|-----|
GGCCGACAAACTAGACAACCTCAACTTTACTGCAGAGCTC

```

Figura 5: Sequência nucleotídica do fragmento do gene *cyp19a1a* obtido para a espécie *Characidium schubarti*.

	10203040506070
<i>Characidium schubarti</i> (Characiformes)	LFLDVPLNEHNLLSKTHKYFDTWQTVLIKPDLYFRLKWLHERHKSAAQELQDAIEELIQQRKTQLLQADR
<i>Cyprinus carpio</i> (Cypriniformes)	...G...D...Q...NV...A...R...RD...AA...E...V...TH...E...
<i>Danio rerio</i> (Cypriniformes)	...G...D...Q...V...D...K...RD...TA...E...KV...AH...E...
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Gasterosteiformes)	...G...FD...KK...L...V...K...G...I...QR...R...I...VE...REVEK...E...
<i>Ictalurus punctatus</i> (Siluriformes)	...Q...F...R...E...F...D...RN...H...D...E...E...Q...E...
<i>Larimichthys crocea</i> (Perciformes)	...VS...KE...L...Q...I...KFA...I...QR...T...KS...VE...KDME...
<i>Odontesthes bonariensis</i> (Atheriniformes)	...G...V...KE...L...Q...I...KFG...I...QR...T...S...VE...GEIE...
<i>Oryzias latipes</i> (Beloniformes)	...G...VD...KE...Q...I...KFS...I...QR...T...S...VER...KEME...E...
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i> (Siluriformes)	...Q...R...N...RNT...H...A...E...E...Q...E...
<i>Silurus meridionalis</i> (Siluriformes)	...EK...Q...I...QD...RN...K...H...E...SE...Q...E...
<i>Oreochromis niloticus</i> (Perciformes)	...N...KE...ML...Q...H...D...I...KFR...I...HR...T...T...KR...VD...KNME...
Consensus	... * * * * *

Figura 6: Alinhamento de aminoácido do fragmento obtido para o gene *cyp19a1a* para *Characidium schubarti* com sequências de outros peixes teleósteos.

Tabela 5: Valores de identidade entre as sequências *decyp19a1a* de *C. schubarti* e outras espécies em %. Em negrito os maiores e menores valores obtidos.

Espécie (Ordem)	% ID
<i>C. carpio</i> (Cypriniformes)	77%
<i>D. rerio</i> (Cypriniformes)	77%
<i>G. aculeatus</i> (Gasterosteiformes)	71%
<i>I. punctatus</i> (Siluriformes)	81%
<i>L. crocea</i> (Perciformes)	71%
<i>O. bonariensis</i> (Atheriniformes)	72%
<i>O. latipes</i> (Beloniformes)	70%
<i>P. fulvidraco</i> (Siluriformes)	82%
<i>S. meridionalis</i> (Siluriformes)	80%
<i>O. niloticus</i> (Perciformes)	67%

Figura 7: Árvore filogenética do gene *cyp19a1a* pelo método Neighbour Joining. Os valores de *bootstrap* para 1000 simulações são indicados nos ramos.

1.6.2 Busca pelo gene *amh* em *Characidium schubarti*

Na tentativa de encontrar a sequência correspondente ao gene *amh* em *Characidium schubarti*, foram realizadas reações de RT-PCR com diversos pares de *primers*.

Com uso do par de *primers* degenerados MisFish FW e MisFish RV desenvolvidos para *Odontesthes bonariensis* (tabela 1) foram obtidos fragmentos com cerca de 400 a 500 pares de bases. Os diferentes fragmentos foram obtidos com base em diferentes temperaturas de hibridação do *primer*, como apresentado na metodologia do estudo.

Os produtos das reações de RT-PCR foram submetido ao alinhamento BLAST com sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank* (NCBI) e foi encontrado correlação com diferentes tipos de sequências, grande parte dela ainda não conhecidas ou caracterizadas.

Dentre estes, dois genes foram identificados: o *IgH* referente à *Salmo Salar* (Salmão), parte de imunoglobulinas, geradas ao se iniciar uma resposta imune - e *Zinc finger protein 40-like* de *Oreochromis niloticus*. Proteínas do tipo *zinc finger* (dedo de zinco) participam da transcrição de genes e tradução de proteínas (Yasuike *et al.*, 2010),

detalhes do alinhamento estão disponíveis na tabela 6.

Tabela 6: sequências identificadas a partir do alinhamento BLAST de fragmentos obtidos para *amh* de *Characidium schubarti*.

Gene	Espécie	Nº de acesso	Identidade (%)	Cobertura (%)
IgH	<i>Salmo Salar</i>	GU129140.1	92%	10%
Zinc fingerprot ein 40-like	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_005452781.1	69%	68%

A partir de reações com o par de *primers* (582F e 881R) para o gene *amh* desenhado a partir de sequências descritas para este gene na espécie *Danio rerio* (Cypriniformes), (ver tabela 1), foram obtidos fragmentos de 500 a 300 pares de bases, fragmentos foram eluídos em gel de agarose e sequenciados, por fim, foram usados em alinhamentos usando a ferramenta BLAST (NCBI).

O algoritmo *discontiguous megablast* mostrou identidade de 79% e 67% de cobertura entre sequências do gene *optic atrophy 1-like* de *Danio rerio* (XM_005165994.1). Esse gene é descrito como tendo importante papel na formação da crista no início do desenvolvimento em mamíferos (Rahn *et al.*, 2013).

Não houve, portanto, a identificação do gene *amh* em tecidos gonadais de machos de *Characidium schubarti* para nenhum dos *conjuntos* de *primes* testados.

1.7 Discussão

1.7.1 Identificação do gene *dmrt1* em *Characidium schubarti*

O gene *dmrt1/DMY*, presente no genoma de vertebrados, apresenta semelhança molecular com os genes *doublesex* (encontrado em *Drosophila melanogaster*) e *mab-3* (*Caenorhabditis elegans*), responsáveis pelo desenvolvimento de gônadas em machos. Segundo Guo e colaboradores (2005) esta é a única semelhança molecular em determinação do sexo encontrada até agora entre os filos. Além disso, o *dmrt1* é um dos genes mais conservados envolvidos na determinação sexual entre os vertebrados, sendo descrito em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (Raymond *et al.*, 1998 ; De Grandi *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009). Esta alta conservação pode ser observada no alinhamento obtido, especialmente na região do domínio DM.

Os valores de identidade obtidos refletem a história evolutiva dos teleósteos, já que a maior identidade foi encontrada entre *Characidium schubarti* (Characiformes) e espécies de Siluriformes (82% e 85%), ambos representantes de Ostaryophysi (Ostaryophysii), que ainda inclui as ordens Gymnotiformes e Cypriniformes. O menor valor foi observado no alinhamento com sequência de *Tukifugu rubripes* (Tetraodontiformes), representante de Acantomorpha, um grupo distante de Ostaryophysii.

O gene *dmrt1* tem como característica principal possuir um domínio (DM), semelhante a um *zinc finger*, que possui a propriedade de se ligar à molécula de DNA além de estrutura e função conservadas. A sua alta similaridade entre os vertebrados reflete a importância do gene no desenvolvimento sexual de machos (Devlin & Nagahama, 2002; Kobayashi *et al.*, 2008).

Ao analisar o domínio DM, as maiores identidades (100%) também foram entre *Characidium schubarti* e espécies da ordem Siluriformes, e o menor valor foi encontrado entre *Characidium schubarti* e *Oryzias latipes* da ordem Beloniformes (88% com variação em 6 aminoácidos), o que ainda é alto, mesmo para um grupo distante (Acantomorpha).

Observando a árvore gerada, três clados possuem altos valores de suporte, um formado pelas espécies pertencentes à ordem Cypriniformes; outro que contém a espécie

alvo do estudo, da ordem Characiformes e espécies de Siluriformes; e o terceiro clado com representantes de ordens de Acantopterygii (Acantomorpha), como Atheriniformes, Beloniformes, Tetraodontiformes, Synbranchiformes e Scorpoaniformes. Exceto pelo posicionamento de Cypriniformes, que não se agrupou com outros Ostariophysii (Characiformes e Siluriformes), as relações encontradas são semelhantes ao observado para a divisão dos peixes teleósteos com relação à suas características morfológicas (Nelson, 2006).

É interessante notar ainda que a espécie *Odontesthes bonariensis* da ordem Atheriniformes, utilizada para desenhar o *primer* de *dmrt1*, apesar de ser filogeneticamente distante de *Characidium schubarti*, possui uma identidade moderada (67%) com esta espécie, o que reforça a forte conservação do gene entre os teleósteos, observada principalmente no domínio DM. Essa similaridade entre as sequências sugere que possivelmente as espécies contidas em cada clado possuem mecanismo de diferenciação sexual semelhante relacionado ao fator de transcrição *dmrt1*, reforçando a importância funcional deste gene na diferenciação sexual de machos de teleósteos.

1.7.2 Identificação do gene *cyp19a1a* em *Characidium schubarti*

O tamanho do gene *cyp19a1a* varia entre as espécies de teleósteos, diferença dada pela diversidade em relação ao número de íntrons (Shao *et al.*, 2013).

O RNAm, por sua vez, possui aproximadamente 1550 pb, portanto, a sequência obtida até o momento para *Characidium schubarti* constitui uma pequena parcial do RNAm do gene *cyp19a1a*, mas ainda assim, representa um importante passo para o conhecimento da diferenciação sexual em Characiformes. O alinhamento entre esta e outras sequências de teleósteos de diferentes ordens mostrou poucos sítios conservados,

entretanto, a função da enzima P450 aromatase (transcrita a partir do gene *cyp19a1a*), tem sido sugerida como altamente conservada entre os teleósteos (Callard *et al.*, 2001).

Esta função está envolvida na diferenciação sexual de fêmeas e na maturação dos oócitos, por ser a enzima chave na conversão de andrógenos em estrógeno (Guiguen *et al.*, 1999).

Apesar de se basear em uma matriz de dados pequena, é possível observar na árvore filogenética a formação de dois principais clados, um formado por espécies da superordem Ostariophysi (representada aqui pelas ordens Characiformes, Siluriformes e Cypriniformes), e outro clado formado por espécies de Acanthomorpha (ordens Perciformes, Atheriniformes, Gasterosteiformes e Beloniformes), refletindo uma relação semelhante à observada com dados morfológicos de teleósteos (Nelson, 2006).

As mesmas conclusões em relação ao *dmrt1* podem ser tiradas, já que os maiores valores foram encontrados para espécies de Siluriformes (*Pseudobagrus fulvidraco* e *Silurus meridionalis*), enquanto que os menores estão relacionados à representantes de Acanthomorpha (*Oreochromis niloticus*, Perciformes).

O par de *primers* utilizado para gerar os fragmentos foi obtido a partir de sequências de *Silurus meridionalis* (Siluriformes) apresentou alta identidade (80%) em relação a outras espécies e no mesmo clado na árvore gerada; *Odontesthes bonariensis*, que também teve sua sequência usada para desenhos de *primers*, para *cyp19a1a* apresentou o valor de identidade médio (72%) e também se encontra em clado distinto, o que pode justificar a dificuldade inicial de identificar a presença do gene em tecidos gonadais de *Characidium schubarti*.

1.7.3 Busca pelo gene *amh* em *Characidium schubarti*

No início do estudo, tentativas de identificar a presença do gene *amh* utilizando *primers* desenhados para uma espécie mais distantes filogeneticamente de *Characidium schubarti* (*Odontesthes bonariensis*) falharam. Acredita-se que as sequências tanto deste gene como as do gene *cyp19a1a* das espécies acima sejam mais distintas em comparação ao que foi observado para o gene *dmrt1*, onde os *primers* desenvolvidos para *Odontesthes bonariensis* obtiveram um resultado positivo. Por isso, foram testados também *primers* desenhados para *amh* de *Danio rerio*, outra espécie constituinte da superordem Ostariophysi, porém não houve resultado significativo que levasse a fragmentos relacionados ao gene alvo.

A função do hormônio AMH (anti Mulleriano) durante o desenvolvimento das gônadas tem sido extensamente estudada em mamíferos, porém ainda é pouco compreendida em outros vertebrados (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005). Até o momento são escassos na literatura estudos que identifiquem a expressão do gene *amh* em espécies de teleósteos, especialmente em grupos como Ostariophysi, sendo *Danio rerio* (Cypriniformes) a única espécie da superordem que possui o gene completo bem caracterizado.

Foi observado para espécies como *Anoploploma fimbria* (Scorpaeniformes) e *Danio rerio* (Cypriniformes), que ao contrário do que é geralmente observado para o domínio DM do gene *dmrt1*, o domínio TGF β (característico do gene *amh*) apresenta baixa identidade em relação aos demais teleósteos e aos outros vertebrados. Entre os peixes marinhos foi observada uma identidade de cerca de 70% entre os domínios TGF β , valor baixo em relação aos altos índices observados para *dmrt1*; já em *Danio rerio*, a identidade entre o seu domínio e o de outros teleósteos ficou entre 42% e 58% apenas. (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2013).

Por isso, o desenho de outros *primers* mais específicos a partir de espécies filogeneticamente mais próximas parece ser essencial para estudos de expressão gênica

do *amh*, entretanto, a busca por sequências disponíveis no *GenBank* identificou apenas 15 espécies diferentes de Teleostei, sendo seis de Ostariophysii: *Danio rerio* mais cinco outras espécies de *Squalius* (Cypriniformes) caracterizadas parcialmente. Este fato impossibilita até o momento o aumento da especificidade dos primers a serem testados em *Characidium schubarti*, já que este é o único representante da ordem Characiformes que está sendo estudado em termos de genes relacionados à diferenciação sexual.

1.8 Conclusão

Mesmo com o crescente número de trabalhos envolvendo teleósteos, principalmente entre as descobertas sobre fortes candidatos a genes mestres envolvidos na via de determinação e diferenciação do sexo, não há até o momento descrições para espécies pertencentes à ordem Characiformes.

Foi possível, mesmo com a obtenção de apenas parte dos genes *dmrt1* e *cyp19a1a* em *Characidium schubarti*, observar similaridades altas com outros Ostariophysii. As relações filogenéticas ajudam a interpretar a variação de aminoácidos entre sequências do gene *dmrt1* e do gene *cyp19a1a* em diferentes ordens, proporcionando dados adicionais para *Characidium schubarti* que confirmam ainda a posição filogenética, já bem estabelecida pela morfologia, deste Characiforme em relação às ordens estudadas neste capítulo.

Para o gene *dmrt1* pode-se ainda confirmar a alta conservação do domínio DM entre os teleósteos, mesmo com a inclusão da primeira espécie da ordem Characiformes (*Characidium schubarti*), até o momento não caracterizada em relação ao gene. Considerando as tentativas de identificação do gene *amh*, conclui-se que há dificuldade em amplificá-lo devido à baixa conservação deste, mesmo entre a sua região mais

conservada (o domínio TGF β), como observado em outros trabalhos. Por isso, são necessários mais estudos não somente em espécies da ordem Characiformes, mas também para outros representantes de Ostariophysi, que possui um grande número de espécies importantes economicamente para o país.

Estudos de genes de diferenciação e determinação sexual em peixes teleósteos têm auxiliado na melhor compreensão do controle molecular e fisiológico do sexo não somente no grupo, mas em todos os vertebrados. É importante que a ordem Characiformes, uma das mais ricas em relação aos peixes teleósteos, seja incluída nesta crescente área de pesquisa.

CAPÍTULO 2. Manejo da reprodução em cativeiro da espécie *Characidium schubarti* (Characiformes).

2.1 Abstract

In the reproduction of teleost fishes, external stimulus such as temperature, light, nutrients, substrate and even population density and social relationships stimulate the brain – pituitary – gonadal axis which is responsible for the chemical way that leads to spawning and fertilization. The biochemical pathway of reproduction has the involvement of such as LH and FSH gonadotropic and steroid hormones. In activities as aquaculture there are no influence of external factors, in this case it is possible to stimulate reproduction via hormonal induction. The carp pituitary extract is the best known hormonal induction method, since it sets fishes to LH and FSH desired levels. In this chapter, it will be presented experiments concerning the reproduction of fishes from the specie *Characidium schubarti*. In these experiments, temperature levels, substrate, nutritional care, and hormonal injection were used to recreate the native environment. By observing developmental gonads in these fishes in captivity throughout one year, we conclude on how the impact of stress level and externalities have influence on fishes. There was no reproduction of individuals in captivity, and this is possibly due to the absence of an environmental factor.

2.2 Resumo

Na reprodução de peixes teleósteos, estímulos externos como a temperatura, a luminosidade, a nutrição, tipo de substrato e até mesmo a densidade populacional e relações sociais, incitam o eixo cérebro-hipófise-gônada, responsável pela via química que leva à desova e à fertilização. A via bioquímica da reprodução tem a participação de hormônios sexuais intrínsecos, como os gonadotrópicos LH e FSH e os hormônios esteroides. Em atividades de aquicultura observa-se a ausência de fatores externos, porém é possível em alguns casos estimular a reprodução de forma artificial, tanto recriando tais fatores como por meio de estímulos intrínsecos diretos com indução hormonal. O extrato hipofisário de carpa é a forma mais conhecida de indução hormonal, por liberar diretamente no peixe reprodutor, níveis de LH e FSH. No presente capítulo apresenta-se experimentos relacionados à reprodução em cativeiro de peixes da espécie *Characidium schubarti*, recriando temperatura e substratos presentes em seu ambiente natural, com auxílio de cuidados nutricionais e ainda com injeção hormonal e fertilização a seco, de casais induzidos. A observação de gônadas desenvolvidas em indivíduos em cativeiro há mais de um ano, demonstra a importância dos cuidados em relação à redução do estresse e de fatores externos próximos a aqueles encontrados no ambiente natural da espécie. Não houve reprodução dos indivíduos no período amostrado em cativeiro, e isto se deve possivelmente à ausência de um fator ambiental.

2.3 Introdução

Os peixes teleósteos possuem as mais variadas formas de reprodução, esta variedade inclui diferentes estratégias, a maior parte das espécies possui reprodução sexuada, porém em algumas espécies é possível observar reprodução assexuada. Em todas as formas, a fisiologia reprodutiva de teleósteos é influenciada por fatores externos e internos.

Nestes animais, a reprodução é dependente da comunicação endócrina que ocorre no eixo cérebro-hipófise-gônada, este é estimulado por fatores ambientais como a temperatura, tipo de substrato, luz, qualidade da água, substrato de desova, nutrição e relações sociais, assim como pelo estado de saúde dos peixes (Rottman *et al.*, 1991; Devlin & Nagahama, 2002).

Considerando que sistemas aquiculturais são caracterizados como ambientes lênticos, neles os peixes deixam de receber certos estímulos externos, fazendo com que não haja uma resposta endócrina apropriada para a indução da maturação final das gônadas, as quais se desenvolvem apenas parcialmente. Sendo assim, a reprodução pode ser obtida por simulação da resposta endócrina natural, por meio da manipulação ambiental, como por exemplo, controle do fotoperíodo, da temperatura e do tipo de substrato ou pela aplicação de substâncias análogas aos estímulos hormonais intrínsecos (Andrade & Yasui, 2003).

É possível então, estimular o processo reprodutivo em peixes por meio de injeção de hormônios gonadotróficos (LH e FSH) de maneira direta. Esses hormônios têm como principal função, estimular as gônadas e outros órgãos como o cérebro, a produzirem hormônios esteroides sexuais. O processo atua como um complemento da quantidade de gonadotrofina produzida pelo organismo receptor, substituindo a quantia que deixou de

ser processada pela ausência das condições ambientais favoráveis causadas pela artificialidade do ambiente, podendo conseqüentemente, proporcionar o aumento nos níveis de hormônios esteroides na corrente sanguínea, sendo este normalmente precedente à desova (Rottman *et al.*, 1991; Moyle & Cech, 2004; Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

O processo de manejo da reprodução de peixes teleósteos em cativeiro já é conhecidamente aplicado desde o final do século XVIII, quando já eram utilizadas técnicas de manejo reprodutivo de maneira artificial em trutas, sendo feita a fertilização a seco por extrusão dos ovos, ainda sem indução hormonal. Atualmente, com o desenvolvimento de novas técnicas, principalmente que utilizam hormônios, o manejo reprodutivo de peixes teleósteos tem se mostrado crescente em todo o mundo, impulsionado pelo constante crescimento da população mundial, associado a cada vez maior demanda por alimentos considerados mais saudáveis, como é o caso da carne branca (Andrade & Yasui, 2003; Mylonas *et al.*, 2009).

Na maioria das criações comerciais, a indução do processo reprodutivo é feita mediante, por exemplo, o uso de hipófise desidratada de carpa, que é aplicada quando diluída em solução fisiológica. Essa técnica é considerada clássica na indução reprodutiva de peixes teleósteos, pelas facilidades em se obterem informações pertinentes na literatura e pela simplicidade em sua execução, tornando-se uma prática bastante difundida (Andrade & Yasui, 2003).

A reprodução, natural ou induzida, um processo complexo que exige um funcionamento biológico normal aliado à resistência a doenças, peixes cultivados para o fim reprodutivo requerem ainda uma dieta nutricional equilibrada, e ajustável. Nutrição, entre outros fatores, pode ainda ter fortes efeitos na tolerância ao estresse e à saúde dos peixes e, contribuindo para um crescimento adequado e resistente a doenças (Oliva-Teles, 2012).

A prática de aquicultura inclui ainda o manejo, o transporte, a triagem, além do confinamento. O estresse induzido por essas práticas tem sido relacionado à mortalidade e considerado um importante fator que afeta negativamente o sucesso reprodutivo de peixes em cativeiro (Barton & Iwama, 1991). O estresse em práticas de aquicultura é inevitável; o reconhecimento de estados de estresse, assim como a manutenção da saúde dos peixes são, portanto, críticos para o sucesso em operações aquiculturais (Iwama *et al.*, 2011).

Em condições de estresse, o nível de cortisol – secretado em resposta ao estresse em peixes – aumenta na corrente sanguínea e, quando secretado em níveis altos por longos períodos, influencia negativamente a saúde, o crescimento e a reprodução desses animais. Tal efeito negativo deve-se provavelmente, ao decréscimo dos níveis de síntese de hormônios gonadotróficos, logo o cortisol pode ter efeitos indiretos no desenvolvimento normal das gônadas (Consten *et al.*, 2001; Milla *et al.*, 2009; Poursaeid *et al.*, 2012).

Dentre todos os processos fisiológicos, a reprodução é considerada um processo altamente custoso energeticamente e ocorre somente quando os animais estão situados na zona de conforto, tanto ambiental quanto metabólica (Ribeiro & Moreira, 2012).

2.3.1 Características do gênero *Characidium*

A ordem Characiformes é constituída por aproximadamente 1674 espécies descritas, todas formadas por peixes de água doce, muitas destas popularmente conhecidas por serem criadas em aquários (Nelson, 2006).

O gênero *Characidium*, parte da ordem Characiformes, é o mais rico em número de espécies dentro da subfamília Characidiinae (Chrenuchidae), a qual é formada por um total de nove gêneros, com cerca de 50 espécies já descritas, ocorrendo em grande parte

da região Neotropical, desde o Panamá até a Argentina (Buckup, 2003). Esses peixes caracterizam-se por serem animais de pequeno porte, sendo que durante o período reprodutivo, algumas espécies (*C. lauroi* e *C. alipioi*) podem alcançar de 5 a 6 cm nas fêmeas e de 4 a 6 cm em machos, e são encontrados em habitats que podem variar em suas características de águas calmas a torrentes (Buckup, 1993; Braga, 2006).

Segundo estudo realizado por Braga (2006), o período reprodutivo das espécies do gênero *Characidium* ocorre durante as estações de primavera e verão, entre os meses de outubro a fevereiro, época em que ocorre a elevação da temperatura e do volume de água nos riachos, com consequente aumento de transporte de nutrientes dos solos para o leito, devido ao aumento das chuvas.

O corpo fusiforme e as nadadeiras peitorais e pélvicas alargadas e expandidas, localizadas na posição ventral, permitem a espécies deste gênero, sustentar-se firmemente no substrato, resistindo ao fluxo da corrente, caracterizando-as, também, como nectobentônicas; o gênero *Characidium* é considerado predador de espreita que se alimentam principalmente de larvas aquáticas bentônicas de insetos (Casatti & Castro, 2006).

Por se manterem parados sobre o substrato, apoiados nas nadadeiras peitorais, membros do gênero *Characidium* são considerados animais curiosos, também pelo pequeno porte e são constantemente utilizados como peixes ornamentais.

Apesar de uma espécie constantemente estudada quanto às características citogenéticas, *Characidium schubarti* (mocinha) é pouco descrito em relação à sua biologia reprodutiva.

2.4 Objetivo

O presente capítulo é parte do projeto iniciado com o intuito de obter alevinos da espécie *Characidium schubarti*, para a análise temporal da expressão de genes envolvidos na diferenciação sexual da espécie, por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR).

Constituindo um processo complexo que exige tempo e também metodologias específicas, as tentativas de reprodução em cativeiro geram por si só, interessantes resultados que agregam ao conhecimento da biologia reprodutiva da espécie, que é pouco descrita na literatura.

Sendo assim, este capítulo tem como objetivo principal descrever condições para criação com qualidade da espécie em cativeiro bem como os efeitos do uso de hormônios exógenos e também das variáveis ambientais, no desenvolvimento reprodutivo de indivíduos machos e fêmeas de *Characidium schubarti*

Essa espécie foi escolhida para o presente estudo por ser um animal de fácil manuseio e possuir técnicas simples de coleta, além de ser de pequeno porte e conhecidamente criado em ambiente de aquário.

2.3 Metodologia

2.3.1 Local de obtenção dos espécimes

Os exemplares foram obtidos a partir de coletas feitas com auxílio da equipe do Laboratório de Ictiogenética do Instituto de Biociências da USP em São Paulo; estas coletas foram realizadas em uma das principais bacias da região sudeste do Brasil a bacia do Rio Paranapanema, sendo o Rio Taquaral - localizado em São Miguel Arcanjo situada no estado de São Paulo, com coordenadas geográficas S24° 02' 803'' W 48°01'716'' - o rio

alvo das coletas (figura 1). Os espécimes foram coletados durante o período de 2 anos, em épocas reprodutivas e não reprodutivas.

O Rio Taquaral tem como características principais, águas correntes, substrato rico em pedras, constante presença de vegetação ciliar e águas relativamente frias, tendo temperaturas variando entre 16°C e 19°C em épocas mais frias (junho e julho) e 20°C a 21°C em épocas mais quentes (outubro a fevereiro).

Para identificação e confirmação das espécies foram aplicadas metodologias genético moleculares, com amplificação do gene COI, largamente usado para estudos de caracterização genética de espécies. Foi feita também identificação morfológica e morfométrica, pelo Dr. Paulo A. Buckup, no Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ). Os exemplares usados na análise morfológica estão disponíveis no museu com número de registro MNRJ39640, os demais se encontram no Laboratório de Ictiogenética do Instituto de Biociências da USP.

Figura 1: a) Localização do município de São Miguel Arcanjo, no estado de São Paulo e localização do Rio Taquaral; b) Rio Taquaral.

Figura 2: Exemplares de *Characidium schubarti* mantidos em aquários no Laboratório de Ictiogenética no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, durante a realização do estudo.

2.3.2 Transporte

O transporte dos animais coletados até o Instituto de Biociências foi feito em baldes com capacidade para 25 litros de água, completados com água do próprio Rio Taquaral. Foram transportados no máximo 8 animais por balde, evitando qualquer confronto ou mudanças bruscas nas variáveis da água, como pH e temperatura e o nível de oxigênio foi controlado nos baldes, com o uso de bombas de aeração para aquários.

Ao colocar os indivíduos nos aquários após coletá-los, foi realizada a climatização, com uso de sacos plásticos com água dos baldes e os animais, mantendo-os em contato com a água dos aquários através do saco plástico por cerca de 10 minutos e somente por fim soltando-os nos aquários, para que o choque, dado a diferenças de temperatura, fosse minimizado.

2.3.3 Manutenção da qualidade da água

Para que as condições dos aquários fossem as mais próximas possíveis das encontradas no ambiente natural, foi instalado um sistema de refrigeração da água, com uso de *chiller* específico para aquários, regulando assim a temperatura próxima à do ambiente natural em que os espécimes foram coletados, mantendo-as então entre 18°C e 21°C. Houve também a instalação de sistema de filtragem para controle da qualidade da água (Figura 3).

A manutenção das condições de qualidade da água como a temperatura, o pH e turgidez foram feitas diariamente. A temperatura foi medida tanto dentro dos aquários quanto na parte externa (ambiente), simultaneamente. A medida de pH da água tanto do Rio Taquaral, quanto dos aquários foi realizada por meio do uso de fitas de papel indicadoras de pH (Merck).

Figura 3: sistema de refrigeração e filtragem instalada nos aquários.

2.3.4 Alimentação

Em relação à alimentação dos animais em cativeiro, foram testadas diferentes tipos de rações, como em flocos e em *pellet* (Alcon®) e também alimentos vivos como *Enchytraeus buchholzi* (Oligochaeta, Terrestre) e também artêmias salinas vivas, recurso bastante utilizado em aquicultura. Alimentos em flocos foram administrados com uso de alimentadores automáticos, que facilitaram a alimentação em períodos controlados, três vezes ao dia.

2.3.5 Substrato

Foram dispostos para os aquários, diferentes tipos de substratos, alguns formados por pedras maiores, outros por pedras menores, e outro aquário por ambos os tipos de pedras, formando assim um substrato misto. Além disso, foram dispostos dentro dos aquários, tijolos do tipo baiano, para que servissem de esconderijo e possível substrato de desova para os animais (Figura 4).

Também foram colocadas plantas aquáticas do tipo elódea (*Elodea canadenses*) em cada um dos aquários visando a melhora na qualidade da água e visando também a diversidade dos tipos de substratos disponíveis.

Figura 4: Diferentes tipos de substratos disponíveis nos aquários de criação dos peixes no laboratório de Ictiogenética, no Instituto de Biociências da USP.

2.3.6 Indução hormonal

Além dos cuidados e tentativas de controles das variáveis ambientais nos aquários como citado, foi realizada também a manipulação da reprodução dos animais em cativeiro através da indução hormonal com uso de extrato hipofisário de carpa para que pudesse ser alcançado o objetivo principal, a fecundação e consequentemente, a obtenção dos alevinos para o estudo temporal da expressão dos genes envolvidos na diferenciação sexual.

A hipófise de carpa desidratada foi macerada e diluída em solução fisiológica de 0,9% de NaCl. Cada hipófise desidratada apresentava cerca de 0,55 g, a solução mãe da diluição em 0,9% de NaCl foi de 0,5 mg/ml a partir desta foram realizadas diluições de 0,05 mg/ml e 0,005 mg/ml.

Tal extrato hipofisário foi administrado na base das nadadeiras peitorais com uso de seringa e agulha hipodérmicas. Para a aplicação do extrato, os animais foram anestesiados com benzocaína 1% e pesados para o cálculo de administração na proporção de 0,5mg/Kg em machos e fêmeas. Os espécimes apresentaram cerca 2,5g a 5g, sendo assim, foi feito um cálculo aproximado da dosagem aplicada, sendo 30 µl em fêmeas e 16 µl em machos.

Após 24 horas da última injeção de hormônio, foi realizado para diferentes casais a fertilização a seco, descrita por von Ihering & Azevedo (1934), na qual após as fêmeas serem anestesiadas em benzocaína 1% foram cuidadosamente secas com auxílio de toalha, e em seguida, foi realizada a extrusão de seus óvulos em um pequeno Becker de vidro, após a coleta dos óvulos da fêmea, coletou-se cerca de 250 µl de esperma dos machos, também anestesiados, com auxílio de uma micropipeta. Os óvulos e o sêmen foram misturados durante 5 minutos em uma pequena quantidade de água e

posteriormente foi efetuada a troca de água, com auxílio de uma pipeta *pasteur* para a retirada do sêmen em excesso.

Após a fertilização em seco foram observados os óvulos ao microscópio estereoscópio para analisar qualquer possível mudança relacionada à fertilização dos mesmos, como a mudança na coloração. Em seguida os óvulos fecundados foram colocados em aquários, separados dos animais criados, em tubos do tipo *Falcon*®, onde foram testados em diferentes temperaturas a 19°C (temperatura controlada por *chiller* nos aquários), 24°C (temperatura ambiente) e a 28°C (temperatura em aquário com termostato).

Além disso, foram realizados também testes de fertilização a seco ainda em campo, com o cuidado de se manterem os ovos acondicionados na temperatura da água colocando-os em tubo *Falcon*® dentro dos baldes de acondicionamento dos animais em temperatura mais próxima à encontrada no rio de coleta.

2.5 Resultados

2.5.1 Manejo das espécies em aquários

Os animais coletados foram mantidos em aquários com controle das variáveis para padronização do manejo da reprodução dos peixes em laboratório. A temperatura dos aquários foi regulada para a mesma observada no ambiente natural. Sendo as medidas feitas na época reprodutiva, no Rio Taquaral variando de 19°C a 20°C, a mesma temperatura foi reproduzida no laboratório. O pH também foi o mesmo em ambos os ambientes, artificial e natural, pH 6,0 a 6,5.

Foram testados diferentes tipos de ração, em floco e também em *pellet*. A ração em flocos (Alcon artemia®) usada tem em sua composição artêmias, além de minerais e vitaminas, e a ração em pellet (Bottom fish®), é formada por alimento extrusado com consistência adequada para alcançar o fundo, sendo um alimento muito utilizado para peixes de fundo, composto por vitaminas e minerais.

Entretanto, a parte não ingerida de um alimento artificial deposita-se no fundo do aquário causando a proliferação de fungos por aumento da matéria orgânica disponível na água, levando à redução da qualidade da mesma e consequentemente à redução da saúde e risco de morte dos indivíduos.

Sendo assim os peixes foram alimentados, principalmente durante a fase reprodutiva, com oligoquetas terrestre, *Enchytraeus buchholzi*, conhecido entre os especialistas em aquicultura como *Grindal worms*, e também por pequenos crustáceos vivos, as artêmias salinas, largamente utilizadas por aquaristas por serem, assim como os oligoquetas, uma rica fonte nutricional, dessa forma, os peixes apresentaram aparência saudável e maior longevidade e atividade física no período.

Com a instalação do sistema de refrigeração e com os cuidados dispendidos com a nutrição dos animais e qualidade da água, como por exemplo, a presença de plantas e de diferentes tipos de substrato, a perda de animais mostrou-se reduzida em relação ao observado no início da pesquisa (2011).

Neste período a média de tempo de vida era de no máximo 3 meses; com os cuidados citados, foi observado um aumento no tempo de vida dos animais, chegando a 10 meses e em dois grupos (5 a 8 animais) o tempo de vida em cativeiro chegou a 1 ano em um grupo e a 2 anos no outro.

Foi observada também melhora em relação ao que foi verificado no início dos estudos, tanto na aparência física dos peixes, como na cor e na aparência das escamas, assim como um aumento na atividade física, indicadores de qualidade do ambiente. Esses

critérios foram definidos com base nas observações dos animais ainda em ambiente natural. No início dos estudos, quando não haviam sido aplicado os cuidados citados, a infecção por ictioparasitas também era mais frequente, consistindo um sinal de estado de saúde irregular.

2.5.2 Indução da desova e espermição em cativeiro

Os animais selecionados para a indução hormonal foram os que se encontravam em fase adulta e aptos à reprodução, com as gônadas já totalmente diferenciadas e desenvolvidas.

O extrato hipofisário foi injetado em dois períodos principais: ao fim da época reprodutiva, com os indivíduos apresentando pouco sinal de gônadas maduras e durante a época reprodutiva do gênero, que compreende os meses de setembro a início de março, como observado durante este estudo.

Para o primeiro período, foram injetadas dosagens de 0,5mg/ml a cada 12 horas, sendo a segunda na fêmea correspondente à primeira injeção nos espécimes machos; foi observado o retorno da espermição nos machos ao espremer lenta e cuidadosamente a região abdominal destes já anestesiados com benzocaína 1%. Nas fêmeas, resultado semelhante não foi observado em relação à ovulação, mesmo sendo realizadas mais aplicações do que as realizadas nos machos; os detalhes das dosagens e intervalos podem ser observados na tabela 1.

Já para o segundo período, aquele em que os animais estão em fase de reprodução, foram injetadas dosagens e quantidades diferentes destas em intervalos de tempo também distintos em machos e fêmeas, e após as injeções foi mantida a observação diária do comportamento e do substrato para possível observação de desova. Após 24 horas da última aplicação foi realizada a fertilização a seco em aproximadamente 30 casais de *C.*

schubarti. As informações de dosagem e intervalos usados para espécimes neste período estão detalhados na tabela 2.

As primeiras aplicações foram realizadas ainda no campo, no momento da coleta, para que o efeito do estresse, relativo a transporte e mudança de habitat, fosse minimizado o máximo possível nestes espécimes. Não houve a fertilização dos ovos após a aplicação da técnica de fertilização a seco, em nenhum dos casos (animais expostos a diferentes temperaturas: 19°C, 24°C e 28°C). Ao serem observados ao microscópio estereoscópio os ovócitos tinham aparência esbranquiçada, indicando não ter havido fecundação correta.

As diferentes dosagens e durações de tratamento foram utilizadas para permitir a elucidação dos períodos críticos de sensibilidade para a manipulação correta da reprodução em cativeiro para espécimes do gênero *Characidium*.

Foram observados 5 animais, em período reprodutivo (final de janeiro) presentes no aquário por período superior a 12 meses (desde novembro/2011 até o momento), com ausência de indução química por injeção de hormônios, fêmeas apresentando um volume abdominal pouco maior daquele observado fora da época reprodutiva e papila urogenital hiperemiada, além de extrusão com presença de gônada e também a espermiação de machos na tentativa de extrusão. Este resultado porém, apresentou-se diferente daquele observado em período reprodutivo para espécimes em ambiente natural (Figura 5).

Sendo animais que não haviam sido expostos à indução química, e sendo criados em cativeiro por tempo maior do que o esperado no início dos estudos, foram privados do estresse contínuo causado por contato antrópico fora da água, para verificação das gônadas, permitindo assim que pudesse ocorrer a fecundação de forma natural.

Apesar de se apresentarem aptos à reprodução, não foram observadas desova e fecundação aparente destes animais.

Tabela 1: Detalhes das dosagens, concentração, intervalo entre as aplicações e o número das mesmas em ambos os sexos durante testes realizados no período final de reprodução (mês de março).

Concentração	Dosagem	Sexo	Intervalo	Número de aplicações
0,5 mg/ml	36 µl	Fêmea	12 horas	3
0,5 mg/ml	16 µl	Macho	12 horas	2

Tabela 2: Detalhes das dosagens usadas à concentração de 0,5 mg/ml e 0,05 mg/ml de extrato hipofisário, intervalo entre as aplicações e o número das mesmas em ambos os sexos durante testes realizados no período reprodutivo (de outubro a fevereiro).

Concentração	Dosagem	Sexo	Intervalo	Número de aplicações
0,5 mg/ml	36 µl	Fêmea	24 horas	2
0,5 mg/ml	36 µl	Fêmea	48 horas	4
0,5 mg/ml	16 µl	Macho	24 horas	2
0,5 mg/ml	16 µl	Macho	48 horas	3
0,05 mg/ml	36 µl	Fêmea	24 horas	3
0,05 mg/ml	36 µl	Fêmea	48 horas	4
0,05 mg/ml	16 µl	Macho	24 horas	3
0,05 mg/ml	16 µl	Macho	48 horas	3

Figura 5: a) Extrusão de gônada em fêmeas em época reprodutiva ainda em campo ; b) extrusão de gônada de macho em época reprodutiva ainda em campo; c) extrusão de gônada de fêmea em época reprodutiva após 24 meses em cativeiro; d) extrusão de gônada de macho em época reprodutiva após 24 meses em cativeiro. Fotos tiradas em outubro/2013.

2.6.1 Manejo das espécies em aquários

Sob condições de aquicultura, os desafios naturais enfrentados pelos animais no ambiente somam-se àqueles impostos pela atividade como as práticas de manejo e transporte (Lima *et al.*, 2006).

Ainda segundo Lima e colaboradores (2006) mudanças fisiológicas desencadeadas quando o peixe reage a desafios químicos, físicos e biológicos somados à tentativa de compensação, são comumente referidos como respostas ao estresse.

Doenças, ferimentos, e má nutrição são as principais ameaças ao equilíbrio orgânico dos animais. Em geral, os sinais positivos de saúde provêm de um bom aspecto

físico, alimentação regular, boa longevidade e taxas de mortalidade reduzidas (Oliveira & Galhardo, 2007).

Assim como foram mantidos grupos pequenos de peixes em baldes durante o transporte dos mesmos ao laboratório, após as coletas, foram mantidos poucos casais em cada aquário, já que o tamanho do tanque, o volume de água e/ou a profundidade e densidade, foram mostrados, como tendo influência no sucesso reprodutivo em alguns peixes de cultura; o comportamento de desova espontânea geralmente requer volumes moderados a volumes grandes de água e densidades populacionais baixas na maioria das espécies de peixes (Taranger *et al.*, 2010).

A manutenção da mesma temperatura medida no local de coleta dos espécimes é importante para a reprodução e também para a saúde destes animais em cativeiro, pois tanto a reprodução quanto o desenvolvimento em peixes são particularmente sensíveis a perturbações na temperatura (Wood & McDonald, 1997). Estudos recentes demonstraram que a exposição às altas temperaturas pode provocar degeneração da gônada e perda de células germinativas em peixes de ambos os sexos, porém o mecanismo envolvido neste processo ainda não está totalmente esclarecido na literatura (Ito *et al.*, 2008).

A fase final da maturação do esperma e a ovulação pelas fêmeas são estimuladas não somente por luz (fotoperíodo) e temperatura, mas também pela presença de um substrato adequado para a desova e a presença de parceiros próximos em estado de prontidão reprodutiva (Moyle & Cech, 2004). Portanto, sabendo a importância também do substrato no manejo da reprodução em cativeiro, foram mantidos em diferentes aquários diferentes tipos de substrato.

Vale ainda, salientar a importância da nutrição como um forte fator envolvido na reprodução de peixes, podendo influenciar no desenvolvimento da gônada quanto no número e qualidade de ovócitos, já que na maturação das gônadas, cada ovócito incorpora

vitelo, que por sua vez fornecerá nutriente e energia para o desenvolvimento larval (Nikolskii, 1969; Navarro *et al.*, 2009).

Em estudos realizados com peixes em aquicultura têm-se observado que uma boa nutrição e alimentação de peixes reprodutores levam a melhoras significativas na qualidade dos óvulos e espermatozoides, assim como há melhora também nos ovos produzidos (Izquierdo *et al.*, 2001). A criação de oligoquetas, e de alimentos vivos como as artêmias tem se mostrado vantajosa para a alimentação de peixes sendo uma fonte barata de proteínas e de qualidade nutricional superior às encontradas em alimentos artificiais (Bouguenec, 1992).

Como foi observado com espécimes envolvidos no estudo, uma atividade nutricional regulada com auxílio de alimentador automático e alimentos ricos em nutrientes e também vivos, auxiliou na qualidade da saúde dos animais e na longevidade. Contudo, o conhecimento acerca do que constitui uma dieta equilibrada é ainda muito restrito, sobretudo para os peixes que mais recentemente têm sido aplicados à aquicultura (Schwedler, 1999).

2.6.2 Indução da ovulação e espermição em cativeiro

O extrato hipofisário de carpa, o mais comumente usado nas criações comerciais, atua diretamente nas gônadas, induzindo a maturação através da liberação de hormônios gonadotróficos (LH e FSH).

O uso da hipófise desidratada apresenta algumas vantagens e desvantagens; as principais vantagens da técnica são principalmente as seguintes (Dumont-Neto *et al.*, 1997; Andrade & Yasui, 2003):

- A facilidade na estocagem, sendo desidratadas em acetona pode ser conservada com facilidade, em ambiente livre de umidade;

- Não requer aquisição de equipamentos sofisticados;
- Possui fácil cálculo de dosagem para aplicação, o que facilita o seu uso;
- O preço é menor em relação aos outros hormônios disponíveis no mercado;

Já em relação às desvantagens as mais citadas são, segundo Andrade-Talmelli e colaboradores (2002):

- Falta de padronização quantitativa;
- Contém de uma única vez, toda a gama de hormônios sintetizados pela hipófise e não somente os hormônios alvo, os gonadotrópicos LH e FSH;

O momento de aplicação é um dos principais aspectos na reprodução induzida, visto que, tanto uma aplicação precipitada quanto uma tardia, tendem a comprometer o processo de maturação das gônadas. O momento é determinado observando nas fêmeas um volume abdominal aumentado e papila urogenital hiperemiada (levemente avermelhada), ou seja, com boa irrigação sanguínea, enquanto nos machos, o mesmo período, pode ser confirmado com a fluidez do sêmen, ao se apertar levemente a região ventral dos mesmos, processo conhecido como extrusão (Andrade & Yasui, 2003).

A aplicação das técnicas convencionais de indução hormonal é indicada para peixes maduros, nessa fase, em que a vitelogênese está completa nos ovócitos das fêmeas, sendo necessária a indução hormonal para garantir a maturação final e desova, que consiste na migração e a posterior desintegração da vesícula germinal, o rompimento do envelope folicular e, conseqüentemente, a liberação dos ovócitos na luz do ovário, seguido pela eliminação destes para o ambiente.

Para os machos, a função básica da indução hormonal é o aumento do volume de sêmen, que está associado com uma maior fluidez do sêmen produzido e não necessariamente com o aumento do número das células espermáticas (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Dessa forma as fêmeas geralmente requerem maiores doses de hormônio que os machos, sendo que doses parceladas produzem resultados melhores do que uma dose única (Woynarovich & Horváth, 1983). Essas informações corroboram nossa observação relacionada ao retorno da espermição em machos apenas depois de duas aplicações em período de final de reprodução.

Além de conhecer bem a técnica de indução por hormônios gonadotróficos, é importante ter também o conhecimento das características da espécie de peixe a ser propagada, como a época e local de desova, características físico-químicas do ambiente, além do comportamento e fisiologia reprodutiva, para que se possa manipular adequadamente a reprodução desses animais (Andrade & Yasui, 2003).

Os tipos de hormônios e protocolos de administração utilizados podem variar dependendo da biologia reprodutiva de cada espécie (Taranger *et al.*, 2010). Devido à escassa informação sobre o comportamento reprodutivo do gênero *Characidium*, para que se tenha sucesso na manipulação da reprodução nestes animais, é necessário o aprimoramento das técnicas de indução hormonal, identificando o momento propício para a utilização de hormônios indutores e definindo a dosagem de hormônio e o período de latência corretos e do número de aplicações necessárias para obtenção da desova e por fim dos alevinos.

Quando o hormônio utilizado é proveniente do extrato de hipófise, há ainda a variação da quantidade de hormônios gonadotróficos presente na hipófise no momento da sua coleta, acrescida pela interferência que o processo de conservação pode oferecer na degradação do hormônio. Essa variação pode ser observada nos diversos protocolos indicados para peixes brasileiros (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Sem a aplicação de hormônios, porém, houve a verificação de papila urogenital hiperemiada com facilidade na extrusão das gônadas em grupos de peixes mantidos em aquários por período superior a 12 meses e igual a 24 meses. Em duas épocas

reprodutivas distintas (2012/2013), há a verificação da época reprodutiva em cativeiro, ou seja, os espécimes receberam estímulos externos capazes de produzir hormônios que levam ao desenvolvimento das gônadas neste período.

Não tendo sido alcançada a reprodução e fecundação com produção de alevinos, acreditamos que haja ausência de algum fator externo presente no ambiente natural, já que por maior que sejam os esforços, muitas vezes a ecobiologia de uma espécie é pouco conhecida, ou ainda é impraticável a simulação dos parâmetros ambientais requeridos pela reprodução natural, sendo assim, apesar de variadas as formas de indução da desova, nem sempre esta é bem sucedida (Mylonas *et al.*, 2009).

2.7 CONCLUSÃO

Sendo parte de um projeto maior, o qual o principal objetivo era a reprodução de espécimes de *Characidium schubarti* em aquários, toda a metodologia utilizada para alcançar tal objetivo, gerou dados importantes para o conhecimento da biologia reprodutiva da espécie.

Tendo pouco conhecimento sobre a biologia reprodutiva da espécie *Characidium schubarti* e mesmo do gênero *Characidium* como um todo, o presente capítulo nos apresenta a alimentação regulada como parte importante na melhora da qualidade de vida dos espécimes de *C. schubarti*; sendo a alimentação um importante fator para o aumento da expectativa de vida no cativeiro e na melhora da resposta imunológica, tendo sido observados animais saudáveis durante longos períodos.

O mesmo pode ser concluído para o papel do substrato, com uso de pedras, semelhantes a aquelas presentes no Rio Taquaral, e ainda o uso de tijolos e presença de vegetação, auxiliaram no controle da qualidade de vida e resistência a doenças e parasitas por mais tempo daquele observado no início do estudo.

Apesar de não ter havido a eclosão e reprodução dos animais em cativeiro, o que provavelmente ocorreu por ausência de algum fator externo, a observação do reconhecimento do período reprodutivo pelos espécimes em aquário, identificado pelo fato de os mesmos estarem com gônadas desenvolvidas, mostra que exposição à temperaturas iguais às do ambiente natural, no qual a espécie foi coletada, o uso de substrato semelhante e nutrição controlada, como fortes fatores envolvidos na reprodução de peixes da espécie *Characidium schubarti*.

É importante que outros estudos envolvendo a biologia reprodutiva e a observação de outros fatores externos e ainda o uso de novas técnicas de indução hormonal sejam realizados para o gênero, gerando assim, o conhecimento necessário para a criação e reprodução da espécie em cativeiro.

Discussão geral e conclusões

A presente dissertação é parte de um projeto que tem como intuito dar início no grupo de pesquisa do Laboratório de Ictiogenética (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, uma nova temática de pesquisa relacionada à investigação do controle molecular envolvido no processo de diferenciação e determinação do sexo em peixes teleósteos Neotropicais.

Tendo em vista que a maioria dos estudos relacionados à determinação e diferenciação sexual em espécies Neotropicais tem se limitado à caracterização citogenética usando técnicas convencionais e mais recentemente técnicas de citogenética molecular, são escassos os estudos genéticos e de biologia molecular envolvidos no mecanismo de determinação e diferenciação sexual destas espécies.

O projeto foi inicialmente dividido em duas etapas; na primeira, o objetivo principal seria identificar marcadores moleculares para determinação do sexo genético em *Characidium schubarti*, facilitando desta forma o diagnóstico sexual nestes animais, inclusive em fases iniciais do desenvolvimento. A segunda etapa consistia em focar no estudo dos principais genes ligados à diferenciação sexual na espécie, *dmrt1*, *amh* e *cyp19a1a*, e também a sua expressão temporal, desde a fase de alevinos até a completa diferenciação das gônadas.

Como visto anteriormente, a espécie *Characidium schubarti* se caracteriza por possuir sistema cromossômico do tipo ZW/ZZ, em que a fêmea é o sexo heterogamético; a primeira parte do projeto baseava-se no isolamento do cromossomo sexual W, por meio da microdissecção e posterior DOP-PCR, para amplificação do material obtido. Após a amplificação do material, este seria sequenciado para isolar sequências exclusivas do cromossomo W, que seriam usadas como marcador molecular sexual.

As técnicas usadas nesta etapa não foram pormenorizadas nesta dissertação, apenas citadas para demonstrar as dificuldades encontradas ao decorrer da etapa, já que não houve finalização desta.

Dado o tamanho reduzido dos cromossomos nesta espécie, houve dificuldade em seu correto isolamento, logo, sua amplificação por DOP-PCR não ocorreu de forma completa. Zhao e colaboradores (2008) construíram uma biblioteca a partir do cromossomo sexual X e a partir disso isolaram sequências repetitivas diferentes entre X e Y.

Porém, segundo Chen e colaboradores (2013 b), são grandes as dificuldades em se isolar sequências ligadas ao sexo em cromossomos sexuais heterocromáticos - como é o caso do cromossomo W de *Characidium schubarti*, como visto anteriormente – já que contém grandes regiões de sequências repetitivas, que também podem dificultar o processo de sequenciamento do material. Sendo assim, a técnica proposta não seria a mais indicada para este fim.

Tendo este projeto sido realizado durante um curso de mestrado, que tem curta duração, não houve tempo suficiente para que estas etapas fossem concluídas como idealizadas a princípio. Desta forma, esta dissertação está dividida em dois capítulos, os quais abordam as realizações baseadas no projeto inicial das duas diferentes vertentes relacionadas ao estudo de mecanismos envolvidos na reprodução da espécie *Characidium schubarti*.

O primeiro capítulo consiste na investigação da ocorrência de genes envolvidos na diferenciação sexual já descrito para outras espécies de teleósteos, em *Characidium schubarti*; como visto neste capítulo, foi possível a identificação de dois dos genes alvos do estudo: *dmrt1* e *cyp19a1a*.

Para o gene *dmrt1* foi possível observar a conservação do domínio DM, também em uma espécie da ordem Characiformes, como já descrito para espécies de outras ordens de teleósteos, com grandes índices de identidade entre as sequências.

Para o gene *cyp19a1a*, apesar do curto trecho obtido, sua relação filogenética com o mesmo gene descrito para outras espécies de teleósteos, uma posição muito semelhante ao já observado para características morfológicas. Relação semelhante também foi apresentado para o trecho de *dmrt1* obtido.

Em geral, o que se nota, é que genes relacionados a processos chaves no mecanismo de diferenciação sexual - como o caso de *dmrt1* e *cyp19a1a* - apresentam sua estrutura conservada e diferenciam-se principalmente em sua expressão, que é dada de forma dimórfica entre ambos os sexos (Cutting *et al.*, 2013).

O capítulo 2 apresenta as observações geradas a partir da tentativa de reprodução em cativeiro de *Characidium schubarti*, parte importante para o estudo temporal da expressão dos genes; este estudo seria realizado por meio da técnica de PCR em tempo real de amostras de tecidos de indivíduos em várias fases, desde a fase larval até a adulta.

Apesar de não ter sido obtido os alevinos desejados para a continuação do estudo nesta etapa, as observações geradas mostram importantes características envolvidas na reprodução da espécie, entre elas, o importante papel do ambiente na maturação final das gônadas e posterior fecundação.

Mesmo tendo sido aplicados hormônios para a aceleração e compensação, o papel do ambiente não pode ser descartado, como a presença de correnteza e até mesmo um substrato adequado para a desova. A ausência de elementos ambientais foi, possivelmente, a causa da não reprodução em cativeiro dos exemplares de *Characidium schubarti*.

Mesmo com as dificuldades encontradas no decorrer do projeto, esta dissertação apresenta grande contribuição nos estudos de biologia reprodutiva da espécie.

Principalmente, por ser um passo importante no início dos estudos genéticos da diferenciação sexual em espécies de peixes Neotropicais. Além disso, oferece uma importante possibilidade de pesquisa que envolve os mecanismos moleculares envolvidos na reprodução de peixes no laboratório de Ictiogenética do Instituto de Biociências, além da criação de peixes para fins reprodutivos, prática nova no grupo de pesquisa.

É comum para peixes com importância econômica, como é o caso de muitas espécies de peixes Neotropicais, a manipulação reprodutiva, visando melhora na produção para consumo. Muitos peixes possuem dimorfismo sexual relacionado à taxa de crescimento ou idade de maturação. Em algumas espécies bastante utilizadas economicamente, como é o caso da tilápia, os machos apresentam uma taxa de crescimento maior que as fêmeas.

Sendo assim, é comum o uso de tecnologias como uso de hormônios para o controle de linhagens monosssexuais (100% machos ou fêmeas), e dessa forma, maior produção de carne para consumo; esta tem sido uma técnica de grande importância na larvicultura de espécies de interesse econômico.

O objetivo de controlar o sexo pode ser alcançado controlando a expressão de fatores importantes na via de diferenciação sexual, espera-se que com os novos estudos envolvendo genes de diferenciação sexual, seja plausível dentro em breve o controle da expressão destes genes, sendo possível assim o controle do fenótipo de forma eficiente (Chen *et al.*, 2013b).

Em estudo de Wang e colaboradores (2010), tilápias transgênicas foram desenvolvidas, nas quais o gene *dmrt1* era super expresso, inibindo assim a expressão de *cyp19a1a*, e reduzindo dessa forma a taxa de estrógeno; tendo no fim, maior número de machos na população. A relação entre os genes *dmrt1* e *cyp19a1a*, apresenta caminhos interessantes para futuros trabalhos relacionados ao controle do sexo em peixes (Smith *et al.*, 2013).

Segundo Volff e colaboradores (2007), a análise comparativa dos genes envolvidos no processo de determinação e diferenciação do sexo em peixes, pode fornecer ainda um panorama sobre a dinâmica do desenvolvimento sexual e sobre a compreensão da evolução de cromossomos sexuais em vertebrados, com ênfase especial em interações com o meio ambiente e papéis na formação das espécies.

É de grande importância, que estudos como este sejam encorajados e aplicados em um número maior de espécies de peixes Neotropicais, principalmente e de interesse econômico, como o caso de *Characidium schubarti*. Além disso, maiores investigações são necessárias para que sejam ressaltadas as importantes colaborações obtidas neste estudo.

Resumo

Os peixes teleósteos representam cerca de metade de todas as espécies de vertebrados já descritas. Esta rica diversidade reflete-se nas diferentes formas de determinação sexual, sendo as principais desencadeadas por influência ambiental e por fatores genéticos. Os genes envolvidos neste mecanismo têm sido caracterizados em diversas espécies de peixes teleósteos, como é o caso dos genes *dmrt1* e *amh* que têm importante papel na diferenciação em machos de teleósteos e o gene *cyp19a1a*, que possui relação com a diferenciação sexual de fêmeas. Têm sido cada vez mais corrente na literatura, estudos envolvendo genes da via de diferenciação sexual em espécies de teleósteos, porém escassas são as informações em relação à ordem Characiformes. Além da genética, a biologia reprodutiva de peixes teleósteos engloba ainda estudos relativos ao papel dos hormônios e do ambiente na reprodução, inclusive na reprodução em cativeiro. A presente dissertação tem como principal objetivo a análise dos genes acima citados na espécie *Characidium schubarti* (Characiformes) - que possui pouca informação sobre sua biologia reprodutiva na literatura-; caracterizando fragmentos dos genes *dmrt1* e *cyp19a1a* e a similaridade destes com os mesmos já descritos em outras ordens de peixes teleósteos. Além disso, foi possível no desenvolver do projeto, obter informações pertinentes em relação ao papel do ambiente e de hormônios exógenos na reprodução da espécie. Espera-se que com o aumento de pesquisas envolvendo genes relacionados ao sexo, o objetivo de controlar o gênero sexual em peixes economicamente importantes possa ser alcançado com sucesso a partir do controle da expressão de fatores da via de diferenciação.

Abstract

Teleost fishes represent about half of all vertebrate species already described. Such a rich diversity is reflected in different forms of sex determination, the main ones being triggered by environmental influences and genetic factors. Genes such as *amh* and *dmrt1* are involved in this mechanism and have been characterized in several teleost fish species, they play an important role in the differentiation of teleost males whereas the *cyp19a1a* gene is related to the female sexual differentiation. Have been increasingly common in the literature, studies concerning the role of genes in sex differentiation in teleosts, however pieces of information regarding the order Characiformes are scarce. Besides genetics, reproductive biology of teleost fishes also includes studies on the role of hormones and environment on reproduction, and also captive breeding. This thesis aims to analyze the aforementioned species in *Characidium schubarti* (Characiformes) genes for which little information exists on their reproductive biology literature featuring fragments of genes *dmrt1* and *cyp19a1a* and the similarity of these with those already described in other orders of teleost fish . Moreover, it was possible to develop the project, obtaining relevant information regarding the role of the environment and exogenous hormones in reproduction of the species. It is expected that with the increase of research involving genes related to sex, in order to control the sexual gender for such an economically important fish can be successfully achieved from the control of the expression of factors of differentiation.

Referências Bibliográficas

- ABASCAL, F; ZARDOYA, R; POSADA D. ProTest: Selection of best-fit model of protein evolution. *Bioinformatics*. 21(9): p. 2104-2105. 2005.
- ALVES, JCP. Estudos citogenéticos no gênero *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Chrenucidae), com análise estrutural e molecular do sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais. 2010. 223 páginas. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Botucatu, SP, 2010.
- ALVES, JCP; PAIVA, LRS; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiforme: Crenuchidae). *Soc. Brasileira de Ictiologia*. 8(1): p. 77-86. 2010.
- ANDRADE, DR; YASUI, GS. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 27(2): p. 166-172. Abr/jun.2003.
- ANDRADE-TALMELLI, EF; KAVAMOTO, ET; NARAHARA, MY; FENERICH-VERANI, N. Reprodução Induzida da Piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), Mantida em Cativeiro. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 31(2): p. 803-811. 2002.
- BARTON, BA; IWAMA, GK. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*. 1: p. 3-26. (1991).
- BRAGA, FMS. Aspectos da reprodução no gênero *Characidium* Reinhardt, 1867 (Crenuchidae, Characidiinae), na microbacia do ribeirão Grande, Serra da Mantiqueira, Sudeste do Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 28(4): p. 365-371, out-dez. 2006.
- BÖHNE, A; HEULE, C; BOILEAU, N; SALZBURGER, W. Expression and sequence evolution of aromatase cyp19a1 and other sexual development genes in East African cichlid fishes. *Molecular biology and evolution*. 30(10): p. 2268-2285. 2013.
- BRATUS, A; SLOTA, E. *DMRT1/Dmrt1*, the Sex Determining or Sex Differentiating Gene in Vertebrata. *Folia Biologica (Kraków)*. 54(3-4): p. 81-86. 2006.
- BRUNNER, B; HORNUNG, U; SHAN, Z; NANDA, I; KONDO, M; ZEND-AJUSCH, E; SCHARTL, M. Genomic Organization and Expression of the Doublesex-Related Gene Cluster in Vertebrates and Detection of Putative Regulatory Regions for *DMRT1*. *Genomics*, 77(1), 8-17. 2001
- BONE, Q; MOORE, R. Biology of fishes. 3 ed, *Taylor & Francis US*. 2008.
- BOUGUENEC, V. Oligochaetes (Tubificidae and Enchytraeidae) as food in fish rearing: a review and preliminary tests. *Aquaculture*, 120: p. 201-217. Jun, 1992.
- BUCKUP, PA. The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 108: p. 225-245, fev-out. 1993.

- BUCKUP, PA. Family Crenuchidae (South American Darters). In: Reis R, Kullander ESO, Ferraris Jr CJ editors. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre. *Edipucrs*. p. 87-95. 2003.
- CALLARD, GV; TCHOUDAKOVA, AV; KISHIDA, M; WOOD, E. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish J. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 79: p 305–314. 2001.
- CAPEL, B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu. Rev. Physiol.* 60: p. 497- 523, 1998.
- CASATTI, L; CASTRO, R. Testing the ecomorphological hypothesis in a headwater riffles fish assemblage of the Rio São Francisco, southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 4(2): p. 203-214. 2006.
- CENTOFANE, L; BERTOLLO, LAC; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*. 54: p. 253-260. 2001.
- CENTOFANE, L; BERTOLLO, LAC; BUCKUP, PA; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Chrenuchidae, Characidiinae). *Hereditas*. 138: p. 213-218. 2003.
- CHARLESWORTH, D; CHARLESWORTH, B; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Hereditas*. 95: p. 118–128. 2005
- CHEN, SX; BOGERD, J; SCHOONEN, NE; MARTIJN, J; DE WAAL, PP; SCHULZ, RW. A progestin (17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 185: p. 1-9. 2013.a
- CHEN, J; HU, W; ZHU, Z. Progress in studies of fish reproductive development regulation. *Chinese Science Bulletin*. 58(1), p. 7-16. 2013. b
- CIOFFI, MB; KEJNOVSKY, E; BERTOLLO, LAC. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and genome research*. 132(4): p. 289-296, 2010
- CIOFFI, MB, MOREIRA-FILHO, O, ALMEIDA-TOLEDO, LF; BERTOLLO, LAC. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *Journal of Fish Biology*. 80(6): p. 2125-2139, 2012.
- CONSTEN, D; BOGERD, J; KOMEN, J; LAMBERT, JGD; GOOS, HJT. Long-term cortisol treatment inhibits pubertal development in male common carp, *Cyprinus carpio* L. *Biol. Reprod.* 64: p. 1063–1071. 2001.
- CUTTING, A; CHUE, J; SMITH, CA. Just how conserved is vertebrate sex determination? *Developmental Dynamics*. 242: p. 380–387. 2013.

- DA COSTA, RB, OS, R; M, R; F, JO. Possibilidades da exploração comercial de peixes reofílicos em cativeiro: Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 6(2), p. 52-73. 2012.
- D'COTTA, H; FOSTIER, A; GUIGEN, Y; GOVOROUN, M, BAROILLER, JF. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of *Tilapia Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*. 59: p. 265-276. 2001.
- DE GRANDI, A; CALVARI, V; BERTINI, V; BULFONE, A; PEVERALI, G; CAMERINO, G; GUIOLI, S. The expression pattern of a mouse *doublesex related* gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mechanisms of development*. 90(2): p. 323-326. 2000.
- DELOFFRE, LA; MARTINS, RS; MYLONAS, CC; CANARIO, AV. Alternative transcripts of *DMRT1* in the European sea bass: Expression during gonadal differentiation. *Aquaculture*. 293(1): p. 89-99. 2009.
- DEVLIN, RH; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 208: p. 191-364. 2002.
- DUMONT-NETO, R; PELLI, A; FREITAS, JL; COSTA, CL; FREITAS, AE; BARBOSA, NDC. Reprodução induzida da Piracanjuba (*Bryconorbignyanus* Valenciennes, 1903) durante a primeira maturação sexual, cultivada em cativeiro na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental de Volta Grande – CEMIG.B. *Instituto de pesca*. 24: p. 105-107. 1997.
- EVANS, DH; CLAIBORNE, JB. The physiology of Fishes; Third edition. *CRC press*. 2005.
- FERNANDINO, JL; GUILGUR, LG; STROBL-MAZZULLA, PH; SOMOZA, GM. Molecular cloning of SOX9, DMRT1 and SF1 cDNA partial sequences in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: p. 145-146. 2003
- FERNANDINO, JI, GUILGUR LG, SOMOZA GM. Dmrt1 expression analysis during spermatogenesis in Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol Biochem*. 32: p. 231- 240. 2006.
- FERNANDINO, JI; HATTORI, RS; SHINODA, T; KIMURA, H; STROBL-MAZZULLA, PH; STRÜSSMANN, CA; SAMOZA, GM. Dimorphic Expression of dmrt1 and cyp19a1 (Ovarian Aromatase) during Early Gonadal Development in Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sexual Development*. 2: p. 316- 324. 2008a.
- FERNANDINO, JI; RS, HATTORI, KIMURA, H; STRUSSMANN, CA; SOMOZA, GM. Expression Profile and Estrogenic Regulation of Anti-Mullerian Hormone During Gonadal Development in Pejerrey *Odontesthes bonariensis* , a Teleost Fish With Strong Temperature-Dependent Sex Determination. *Developmental Dynamics*. 237: p. 3192-3199. 2008b.
- GITTLEMAN, JL The phylogeny of parental care in fishes. *Animal Behaviour*. 29: p. 936-941. 1981.

- GOHIN, M; BODINIER, P; FOSTIER, A; CHESNEL, F; BOBE, J. Aromatase is expressed and active in the Rainbow Trout oocyte during final oocyte maturation. *Molecular Reproduction & Development*.78: p. 510-518. 2011.
- GRAVES, JAM. The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes.*Philosophical Transactions: Biological Sciences*. 350(1333): p. 305-312. 1995.
- GUAN, G; KOBAYASHI, T; NAGAHAMA, Y; Sexually Dimorphic Expression of Two Types of DM (*Doublesex/Mab-3*)-Domain Genes in a Teleost Fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*).*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272: p. 662- 666. 2000.
- GUIGUEN Y; BAROILLER JF; RICORDEL MJ; ISEKI K; MCMEEL OM; MARTIN SAM; FOSTIER A. 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: p. 154–162. 1999.
- GUO, Y; CHENG, H; HUANG, X; GAO, S; YU, H; ZHOU, R. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish Dmrt1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.330: p. 950-957. 2005.
- HALL, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl.Acids.Symp. Ser.* (41): p.95-98.
- HALM, S; ROCHA, A; MIURA, T; PRAT, F; ZANUY, S. Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: Its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms.*Gene*. 388(1): p.148-158. 2007.
- HATTORI, RS; MURAI, Y; OURA, M; MASUDA, S; MAJHI, SK; SAKAMOTO, T; FERNANDINO, JI; SOMOZA, GM; YOKOTA, M; STRÜSSMANN, CA. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *PNAS*. 109(8): p. 2955-2959.2012.
- HENNING, F. Evolução de cromossomos sexuais no gênero *Eingmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). Dissertação (mestrado) Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. São Paulo, SP. 61 páginas. 2007.
- HERRERO, JD, GARCÍA, MI, CAÑAVERAS, RMP, MOLINA, RMM. Influencia del sistema visual en la reproducción de los peces. p. 191-217.2000
- HUANG,X; GUO, Y; SHUI, Y; GAO, S; YU, H; CHENG, H; ZHOU, R . Multiple alternative splicing and differential expression of dmrt1 during gonad transformation of the rice field eel. *Biology of reproduction*.73(5): p. 1017-1024, 2005.
- ITO, LS, TAKAHASHI, C, YAMASHITA, M, STRUSSMANN, CA. Warm Water Induces Apoptosis, Gonadal Degeneration, and Germ Cell Loss in Subadult *Pejerrey Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes).*Physiological and Biochemical Zoology*.81(6): p. 762- 774. 2008.
- IZQUIERDO, MS, FERNANDÉZ-PALACIOS, H, TACON, AGJ.Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish.*Aquaculture*.197: p. 25-42. 2001.

- IWAMA, GK; PICKERING, AD; SUMPTER, JP. Fish stress and health in aquaculture vol. 62. *Cambridge University Press*. 2011.
- JONES, DT; TAYLOR, WR; THORNTON, JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comp. Appl. Biosci.* 8: p. 275-282. 1992.
- KAMIYA, T; KAI, W; TASUMI, S; OKA, A; MATSUNAGA, T; MIZUNO, N; FUJITA, M; SUETAKE, H; SUZUKI, S; HOSOYA, S; TOHARI, S; BRENNER, S; MIYADAI; VENKATESH, B; SUZUKI, Y; KIKUCHI, K. A Trans-Species Missense SNP in *Amhr2* Is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics*. 8: p. 1-10. 2012.
- KARUBE M, FERNANDINO JI, STROBL-MAZZULLA PH, STRÜSSMANN CA, YOSHIZAKI G. Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome P-450 aromatase (*cyp19A1*) gene during the thermolabile sex determination period in Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *J Exp Zool*. 307: p.625–636. 2007.
- KEJNOVSKY E; HOBZA R; CERMÁK T; KUBÁT Z; VYSKOT B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*. 102: p.533-541. 2009.
- KIKUCHI, K; HAMAGUCHI, S. Novel Sex-determination genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics*. p. 1-15. 2013.
- KLUVER, N; PFENNIG, F; PALA, I; STORCH, K; SCHLIEDER, M; FROSCHAUER, GUTZEIT, HO; SCHARTL, M. Differential Expression of Anti-Müllerian Hormone (*amh*) and Anti-Müllerian Hormone Receptor Type II (*amhrII*) in the Teleost Medaka. *Developmental Dynamics*. 236: p.271–281. 2007.
- KOBAYASHI, T; KAJIURA-KOBAYASHI, H; GUAN, G.; NAGAHAMA, Y. Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9a during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental Dynamics*. 237(1): p. 297-306. 2008.
- KOLM, N. Parental care. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of fishes (Agnathans and Body Fishes)*. Science Publishers. 8: p. 351-371. 2009.
- LARSON, ET. Neuroendocrine Regulation in Sex-changing Fishes. In: *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 1-Fishes*. Elsevier. p. 149-164. 2011.
- LÉVÊQUE, C., OBERDORFF, T., PAUGY, D., STIASSNY, MLJ., TEDESCO, PA., Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*. 595: p. 545-567. 2008.
- LI, M; WANG, L; WANG, H; LIANG, H; ZHENG, Y; QIN, F; WANG, Z. Molecular cloning and characterization of *amh*, *dax1* and *cyp19a1a* genes and their response to 17 α -methyltestosterone in pengze crucian carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2013.
- LIMA, LC, RIBEIRO, LP, LEITE, RC, MELO, DC. Estresse em peixes. Ver Brasileira de Reprodução Animal, 30(¾): p. 113-117. 2006.
- LIU, Z; MOORE, PH; MA, H; ACKERMAN, CM; RAGIBA, M; YU, O; PEARL, HM; KIM, MS; CHARLTON, JW; STILES, JI; ZEE, FT; PATERSON, AH; MING, R. A

- primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Letters to Nature*.427(22). 2004.
- LIU, Z; WU, F; JIAO, B; ZHANG, X; HU, C; HUANG, B; WANG, D. 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*. 194: p 223-241. 2007.
- MAISTRO, E; MATA, E; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum*(Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica*.104: p. 1-7. 1998.
- MARCHAND, O; GOVOROUN, M; D'COTTA, H; McMEEL, O; LAREYRE, JJ; BERNOT, A; LAUDET, V; GUIGUEN, Y. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochimica et Biophysica Acta*.1493: p. 180-187. 2000.
- MATSUDA, M; NAGAHAMA, Y; SHINOMIYA; SATO, T; MATSUDA, C; KOBAYASHI, T; MORREY, C; SHIBATA, N; ASAKAWA, S; SHIMIZU, N; HORI, H; HAMAGUCHI, S; SAKAIZUMI, M. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the Medaka fish. *Nature*.417: p. 559-562. 2002.
- MELO, MRS. Sistemática, filogenia e Biogeografia do Grupo *Characidium lauroi* Travassos, 1949 (Characiformes, Crenuchidae). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 95p. 2001.
- MILLA, S., WANG, N., MANDIKI, S. N. M., & KESTEMONT, P. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction?. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 153(3): p. 242-251. 2009.
- MIURA, T; MIURA, C; KONDA, Y; YAMAUCHI, K. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development*. 129: p. 2689–2697. 2002.
- MYLONAS, CC; FOSTIER, A; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*.165: p. 516-534. 2009.
- MYOSHO, T; OTAKE, H; MASUYAMA, H; MATSUDA, M; KUROKI, Y; FUJIYAMA, A; NARUSE, K; HAMAGUCHI, S; SAKAIZUMI, M. Tracing the Emergence of a Novel Sex-Determining Gene in Medaka, *Oryzias latipes*. *Genetics Society of America*.191: p. 163-170. 2012.
-] MOYLE, P.B. & J.J. CECH. Fishes: An Introduction to Ichthyology. Londres, Prentice-Hall Inc., 4 ed, 2004.
- NAKAMURA, M.; BHANDARI, RK; HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. p. 113-117. 2003.
- NANDA, I; KONDO, M; HORNUNG, U; ASAKAWA, S; WINKLER, C; SHIMIZU, A; SHAN, Z; HAAF, T; SHIMIZU, N; SHIMA, A; SCHMID, M; SCHARTL, M.A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the Medaka *Oryzias latipes*. *Genetics (PNAS)*. 99(18): p. 11778-11783. 2002.

- NAVARRO, RD, FILHO, OPR, FERREIRA, WM, PEREIRA, FKS. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literaruta. *Brasileira de Reproduçãohumana*.33(1): p. 20-25. 2009.
- NELSON, JS. Fishes of the World. 4 ed. *Wiley.com*. 2006.
- NIKOLSKII, G.V. Theory of fish population dynamics as the biological background for rational exploitation and management of fishery resources.*Edinburgh: Oliver & Boyd*. p. 320. 1969.
- NOLETO, RB; AMORIN, AP; VICARI, MR; ARTONI, RF; CESTARI, MM. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites.*Journal of Fish Biology*.75: p. 448-453. 2009.
- OHNO, S. Sex chromosomes and sex-linked genes.*Springer*,Berlin, 1967.
- OLIVA-TELES, A. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases*.35 (2): p. 83-108. 2012.
- OLIVEIRA C, FORESTI F, ALMEIDA-TOLEDO LF. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: *Fish Cytogenetics*. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. eds. Enfield, *Science Publisher*.p.111-164. 2007.
- OLIVEIRA, RF; GALHARDO, L. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. *Rev. Bras. Zootecn*. 36: p. 77-86. 2007.
- OHTSUKA, M; MAKINO, S; YODA, K; WADA, H; NARUSE, K; MITANI, H; INOKO, H. Construction of a linkage map of the medaka (*Oryzias latipes*) and mapping of the Da mutant locus defective in dorsoventral patterning. *Genome research*. 9(12): p. 1277-1287. 1999.
- OZOUF-COSTAZ, C; BRANDT, J; KORTING, C; PISANO, E; BONILLO, C; COUTANCEAU, JP; VOLFF, JN. Genome dynamics andchromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Sci*. 16: p.51-57. 2004.
- PALA, I; KLUVER, N; THORSTEINSDÓTTIR, S; SCHARTL, M; COELHO, MM. Expression pattern of anti-Müllerian hormone (amh) in the hybrid fish complex of *Squaliusalburnoides*. *GENE* 410: p. 249-258. 2008.
- PANDIAN, T. J. Genetic Sex Differentiation in Fish.*CRC Press*. 2012.
- PARK, JW; TOMPSETT, A; ZHANG, X; NEWSTED, JL; JONES, PD; AU, D; KONG, R; WU, RSS; GIESY, JP; HECKER, M. Fluorescence in situ hybridization techniques (FISH) to detect changes in CYP19a gene expression of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 232: p. 226-235. 2008.
- PATIÑO, R; DAVIS, KB; SCHOORE, JE; UGUZ, C; STRUSSMANN, CA; PARKER, NC; SIMCO, BA; GOUDIE, CHA. Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperqature. *J. Exp. Zool*. 276: p. 209-218. 1996.

- PEREIRA, LHG, MAIA, GMG, HANNER, R, FORESTI, F, OLIVEIRA, C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*.21: p. 1-9, 2010.
- POONLAPHDECHA, S; PEPEY, E; CANONNE, M; DE VERDAL, H; BAROILLER, JF; D'COTTA, H. Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *General and comparative endocrinology*. 193: p. 234-242. 2013.
- POURSAEID, S; FALAHATKAR, B; MOJAZI AMIRI, B; VAN DER KRAAK, G. Effects of long-term cortisol treatments on gonadal development, sex steroids levels and ovarian cortisol content in cultured great sturgeon *Husohuso*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 163(1): p. 111-119. 2012.
- RAHN, JJ; STACKLEY, KD; CHAN, SS. Opa1 Is Required for Proper Mitochondrial Metabolism in Early Development. *PloS one*. 8(3): e59218. 2013.
- RAYMOND, CS; SHAMU, CE; SHEN, MM; SEIFERT, KJ; HIRSCH, B; HODGKIN, J; ZARKOWER, D. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*. 391(6668): p. 691-695. 1998.
- RIBEIRO, CS; MOREIRA, RG. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. *Revista da Biologia*. 08: p.58-61. 2012.
- RODRÍGUEZ-MARI, A; YAN, Y; BREMILLER, RA; WILSON, C; CAÑESTRO, C; POSTLETHWAIT, JH. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expression Patterns*.5: p. 655–667. 2005.
- ROUILLER-FABRE, V. CARMONA,S; MERHI, AS; CATE, R; HABERT, R; VIGIER B. Effect of anti Mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats *Endocrinology*. 139 (1998): p. 1213–1220. 1998.
- ROZEN, S; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* Humana Press. p.365-386. 1999.
- SADOVY, Y.; SHAPIRO, DY. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*, p. 136-156. 1987.
- SANDRA, GE; NORMA, MM. Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*.20(1): p. 101-121. 2010.
- SATO,T; YOKOMIZO, S; MATSUDA, M; HAMAGUCHI, S; SAKAIZUMI, M. Gene-centromere mapping of medaka sex chromosomes using triploid hybrids between *Oryzias latipes* and *O. luzonensis*. *Genetica*.111: p.71-75. 2001.
- SCHWEDLER, TE. Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture. *Animal Welfare Information Center Bulletin*. 1999
- SENIOR, AM; LIM, JN; NAKAGAWA, S. The fitness consequences of environmental sex reversal in fish: a quantitative review. *Biological Reviews*. 87(4): p. 900-911. 2012.

- SHAO, C; LIU, G; LIU, S; LIU, C; CHEN, S. Characterization of the cyp19a1a gene from a BAC sequence in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and analysis of its conservation among teleosts. *Acta Oceanologica Sinica*. 32(8): p. 35-43.2013.
- SINCLAIR, AH; BERTA, P; PALMER, MS; HAWKINS, JR; GRIFFITHS, BL; SMITH, MJ; FOSTER, JW; FRISCHAUF, AM; LOVELL-BADGE, R; GOODFELLOW, P. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*.346: 240-244. 1990.
- SMITH, EK; GUZMÁN, JM; LUCKENBACH, JA. Molecular cloning, characterization, and sexually dimorphic expression of five major sex differentiation-related genes in a Scorpaeniform fish, sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2013
- SMITH, CA; ROESZLER, KN; OHNESORG, T; CUMMINS, DM; FARLIE, PG; DORAN, TJ; SINCLAIR, HA. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*.416: p. 267-271. 2009.
- SWANSON, P; DICKEY, JT; CAMPBELL, B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and biochemistry*. 28: p. 53-59. 2003.
- TAKEHANA, Y; Naruse, K; Hamaguchi, S; Sakaizumi, M. Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryziashubbsi* and *O. dancena*. *Chromosoma*, 116(5): p. 463-470. 2007.
- TAMURA, K; PETERSON, D; PETERSON, N; STECHER, G; NEI, M; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.*Molecular biology and evolution*.28(10): p. 2731-2739. 2011.
- TARANGER, GL; CARRILO, M; SCHULZ, RW; FONTAINE, P; ZANUY, S; FELIP, A; WELTZIEN, F; DUFOUR, S; KARLSEN, O; NORBERG, B; ANDERSSON, E; HANSEN, T. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*.165: p. 483-515. 2009.
- TEVOSIAN, S. DMRT1 Owner's Manual: Synchronized Installation Required to Operate. *Biology of reproduction*. 88(2): p. 50, 2013.
- TRANT, JM. Isolation and Characterization of the cDNA Encoding the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Form of Cytochrome P450arom. *General and comparative endocrinology*. 95(2): p. 155-168. 1994.
- UNO, T; MAYUMI, I; TAKAO, I. Cytochrome P450 (CYP) in fish.*Environmental Toxicology and Pharmacology*.34(1):p. 1-13.2012.
- VAZZOLER, AEADEM. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. *EDUEM: Maring*. 1996.
- VICARI, MR; ARTONI, RF; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, LAC. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in Characidium fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica*.134(3): p. 311–317. 2008.

- VIZZIANO-CANTONNET, D; BARON, D; MAHÈ, S; CAUTY, C.; FOSTIER, A; GUIGUEN, Y. Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*.41(5): p. 277-288. 2008.
- VOLFF, JN; NANDA, I; SCHMID, M; SCHARTL, M. Governind Sex Determination in Fish: Regulatory Putsches and Ephemeral Dictators. *Sexual Development*. 1(2): p. 85-99. 2007.
- Von IHERING, R.; AZEVEDO, P. A curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodusargenteus*). *Archivos do InstitutoBiológico*. 5: p.143-184. 1934.
- WANG, XG; ORBAN, L. Anti-Müllerian Hormone and 11-Hydroxylase Show Reciprocal Expression to That of Aromatase in the Transforming Gonad of Zebrafish Males.*Developmental Dynamics*.236: p. 1329-1338. 2007.
- WANG , X; ZHANG , Q; REN, J; JIANG, Z; WANG , C; ZHUANG, W; ZHAI, T. The preparation of sex-chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture*.297: p. 78-84. 2009.
- WETERING, MV; OOSTERWEGEL, M; NORREN, KV; CLEVERS, H. Sox-4, an SRY-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *The EMBO journal*.12(10): p. 3847- 3854. 1993.
- WILKINS A. Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays*. 17: p. 71–77. 1995.
- WOOD, CM, McDONALD, DG. Global warming: Implications for freshwater and marine fish. *Cambridge Univ. Press, Cambridge*. 425. 1997.
- WOYNAROVICH, E; HORVÁTH, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. *FAO/CODEVASF/CNPq*. 1983.
- WU, CC; TOMY, S; CHANG, CF. The Expression of nr0b1 and nr5a4 During Gonad Development and Sex Change in Protandrous Black Porgy Fish, *Acanthopagruschlegeli*. *Biology of Reproduction*. 78: p. 200–21. 2008.
- YAMAMOTO, TO.Sex Differentiation. *Fish physiology*. 3: p. 117-175.1969.
- YASUIKE, M; DE BOER, J; VON SCHALBURG, KR; COOPER, GA; MCKINNEL, L; MESSMER, A; KOOP, BF. Evolution of duplicated IgH loci in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *BMC genomics*. 11(1): 486. 2010.
- YOSHIMOTO, S; OKADA, E ; UMEMOTO, H; TAMURA,K; UNO, Y; NISHIDA-UMEHARA, C; MATSUDA, Y; TAKAMATSU, N; SHIBA,T; ITO, M. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Development Biolog*. 105: p. 2469-2474. 2007.
- YOSHINAGA, N; SHIRAISHI, E; YAMAMOTO, T; IGUCHI, T; ABE, SI; KITANO, T. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys*

olivaceus. *Biochemical and biophysical research communications*. 322(2): p. 508-513. 2004.

ZANIBONI FILHO, E; WEINGARTNER, M. Técnicas de Indução da Reprodução de Peixes Migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31(3): p. 367-373. 2007.

ZHAO, G; YU, QX; ZHANG, WW; ZHANG, YM; CHEN, J; LONG, H; LIU, JD. The 5S rDNA related repetitive sequences in the sex chromosomes of the spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*). *Cytogenetic and Genome Research*. 121(2): p. 143-148. 2008.