Mateus Contar Adolfi

**Desenvolvimento gonadal e clonagem molecular de Dmrt1
(doublesex and mab-3-related transcription factor-1) e Sox9
em teleósteos sul-americanos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

**São Paulo
2011**

Mateus Contar Adolfi

**Desenvolvimento gonadal e clonagem molecular de Dmrt1
(doublesex and mab-3-related transcription factor-1) e Sox9
em teleósteos sul-americanos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

Versão original

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Adolfi, Mateus Contar.

Desenvolvimento gonadal e clonagem molecular de Dmrt1 (doublesex and mab-3-related transcription factor-1) e Sox9 em teleósteos sul-americanos / Mateus Contar Adolfi. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Maria Inês Borella.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Endocrinologia de peixes.

Versão do título para o inglês: Gonadal development and molecular cloning of Dmrt1 (doublesex and mab-3-related transcription factor-1) and Sox9 in South American teleosts.

Descritores: 1. Teleostei 2. Diferenciação sexual 3. Clonagem molecular 4. Expressão gênica 5. Osteoglossiformes 6. Characiformes I. Borella, Maria Inês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0199/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mateus Contar Adolphi.

Título da Dissertação: Desenvolvimento gonadal e clonagem molecular de Dmrt1 (doublesex and mab-3-related transcription factor-1) e Sox9 em teleósteos sul-americanos.

Orientador(a): Maria Inês Borella.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **57** nas fls. **70** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Inês Borella, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Desenvolvimento gonadal e clonagem modecular de DMRT1 (doublesex and mab-3-related transcription factor-1) em pirarucu (Arapaima gigas, Teleostei, Osteoglossiformes, Arapaimidae) e lambari (Astyanax altiparanae, Teleostei, Characiformes, Characidae)** do qual participou(aram) o(s) alunos **Mateus Contar Adolffi, Chayrra Chehade Gomes, Vanessa Xavier Linhares de Andrade**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **23.04.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de abril de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos meus pais por confiarem no meu
sonho e sempre apoiarem
minhas ambições.

AGRADECIMENTOS

Ao redigir estes agradecimentos é perceptível que não existe número de páginas ou palavras que consigam expressar o quanto cada pessoa foi importante na realização e na conclusão desta dissertação. Então aqui estou agradecendo não só aqueles que me ajudaram diretamente com meu trabalho, mas também àqueles que, de alguma forma, significativamente, me deram forças, e me fizeram acreditar e seguir em frente nas dificuldades desse período e da vida.

Aos meus pais, Dario e Valeria, que são meus exemplos de determinação, força, valores e fé. Tenho certeza que minha família estará olhando por mim aonde quer que eu vá, tendo escolhido o caminho que for.

Aos meus irmãos Maurício, Marcelo, Marcus Vinicius, Isadora e Isabela, que juntos tivemos que conviver e aprender um com o outro e respeitando a diversidade dentro do lar.

Ao Prof. Dr. Fabiano Gonçalves Costa, que foi meu companheiro e tutor durante meus primeiros anos de laboratório, onde depositou sua confiança num ingênuo e atrapalhado aluno de primeiro ano de graduação. Agradeço por despertar em mim o interesse enorme pelo que faço e pela grande amizade que temos.

À Dra. Ana Cláudia Oliveira Carreira, que sem sua ajuda jamais conseguiria fazer com que meu projeto saísse do papel, me acolhendo dentro do Bloco 9 do Instituto de Química. Obrigado pela enorme ajuda, não apenas intelectual, mas como um exemplo de pesquisadora, solícita e que acredita que todas as áreas da biologia têm sua importância e merecem seu respeito e investimento.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Inês Borella, pela oportunidade de poder fazer minha Iniciação Científica e Mestrado em seu laboratório, sempre me passando confiança e sendo um exemplo de sabedoria, respeito, compreensão e amizade. Você é minha mãe acadêmica, obrigado por tudo.

À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar por permitir com que pudesse utilizar os recursos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) e do Núcleo de

Terapia Celular e Molecular (NUCEL) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – IQ/USP.

Ao Prof. Manfred Scharl da Universität Würzburg, Alemanha. Obrigado por ter me aceitado durante o período de 4 meses que fiz estágio em seu laboratório e podendo assim, entrar em contato com as últimas técnicas e tecnologias na área de pesquisa de biologia molecular e microscopia. Agradeço também pelo convite inesperado de fazer o doutorado inteiro sob sua orientação.

Ao Dr. Amauri Herpin e ao Dr. Daniel Liedtke que inflaram meu cérebro de conhecimento e de pensamento científico, sendo os meus “papers com rosto”!

Ao Dr. Sergio Ricardo Batlouni, por ser um exemplo de pesquisador e conhecedor da área de reprodução de peixes, tanto na parte morfológica quanto na de manejo. A cada encontro acabo sempre aprendendo cada vez mais, sendo uma honra enorme tê-lo em minha banca de qualificação.

À Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan e ao Prof. Dr. Fabio Siviero por colaborar com os conhecimentos na área de desenvolvimento, principalmente no meu exame de qualificação e durante as aulas de “Embriologia Molecular”.

Aos amigos e colegas de laboratório, Chayrra, Lázaro, Gisele e Telma, que sempre foram meu porto seguro para extravasar, descontrair, discutir, coletar e que ajudaram enormemente para que esse trabalho fosse concluído.

À Dra. Sara Maria Zago Gomes, por ser aquela pessoa especial, que consegue ao mesmo tempo ser a luz intelectual e o ombro amigo nas horas de aperto.

Ao técnico Cruz Alberto Mendoza Rigonati, que sempre esteve do meu lado, me ajudando desde o primeiro corte no micrótomo até coletas desesperadas de última hora em Salto Grande.

Ao Dr. Rafael Henrique Nóbrega, que desde sempre foi um modelo de perfeccionismo, inteligência e educação a ser seguido. Obrigado por toda ajuda acadêmica e de vida.

À Dra. Elizabeth Romagosa, por toda ajuda intelectual e por fornecer os contatos necessários das pisciculturas, onde foram feitas as coletas.

A todos os “milhões” de alunos da Profa. Mari Cleide Sogayar, por toda amizade, companheirismo e ajuda durante todo período de mestrado. Um agradecimento especial para Gustavo (Chefinho), Marina, Heloisa, Michele, Flávia, Mateus, Tatiane, Nathali, Gabriel, Rosângela, Raquel e Regina.

À Fernanda Marques Câmara Sodré, por ser uma grande amiga e por ter sido uma parte muito importante da minha vida, e que sem sua ajuda jamais teria conseguido realizar meu projeto.

Aos alunos da Profa. Chao Yun Irene Yan, Ricardo, Tati, Magá e em especial ao Ms. Felipe Vieceli que pacientemente me ajudou durante os estágios iniciais do meu projeto, sempre sendo solícito e elucidativo.

À Vanessa, que foi o pontapé inicial que fez com que eu entrasse em contato com a parte de diferenciação sexual em peixes. Apesar do curto período que passou pelo laboratório, teve uma “mão” muito significativa em meu projeto.

Aos alunos da Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira, Paulo, Jajá, Jaboti Cadu, Bruno, Tiago e Renato, sempre dispostos a discutir e complementar de alguma forma com os conhecimentos na área de reprodução de peixes.

Aos alunos do programa de pós-graduação do Centro de Aqüicultura da UNESP – CAUNESP, pela ajuda na manutenção e coleta dos pirarucus.

À Profa. Monica de Toledo Piza Ragazzo, por me impressionar mais ainda com a diversidade de espécies de peixes e me ajudar a compreendê-las durante as aulas de “Ictiologia Básica”.

À Mariana de Jesus Cintra, que sempre esteve do meu lado nos momentos de fraqueza e de felicidade durante os 2 anos que estivemos juntos.

A todos meus amigos de graduação do Instituto de Biociências – IB/USP. Nesse mundo acadêmico e na vida, cada dia se torna mais claro que as pessoas

que entram na sua vida podem sempre te engrandecer de alguma forma. Meus amigos eu guardo cada um no meu coração como algo de mais precioso, pois eles conviveram com diferentes personalidades minhas e ajudaram a confeccionar o ser humano que sou hoje. Amo muito vocês.

A todos meus amigos que fiz em Würzburg, Luciana, Steffi, Isa (Maria), Inês, Peter, Daniel, Alex, Max, Anne, Johannes, Isabel, Toni e Katja, que foram essenciais para que eu aguentasse as saudades do Brasil! *Ich komme gleich wieder, warte auf mich!*

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo – CESP/Paraibuna, principalmente ao pesquisador Danilo Caneppele que foi sempre solícito em doar as larvas e adultos de lambari.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Salto Grande-SP, pelo fornecimento dos piaparas em um dia de chuva e frio.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Às secretarias do departamento, Ana Lúcia, Celiana, Beth e Eloíse, pelo atendimento e pela ajuda.

Às funcionárias da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas na ajuda finalização desta dissertação.

À FAPESP, processo nº 2009/07010-6, pela bolsa concedida, sendo um incentivo muito importante para o desenvolvimento da pesquisa no país.

*"Nada em biologia faz sentido a não
ser sob a luz da evolução."*

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

ADOLFI, M. C. **Desenvolvimento gonadal e clonagem molecular de Dmrt1 (doublesex and mab-3-related transcription factor-1) e Sox9 em teleósteos sul-americanos**. 2011. 74f. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Este trabalho, através de técnicas de clonagem molecular, analisou as sequências dos genes Dmrt1 e Sox9 em três espécies de teleósteos sul-americanos, cujas funções estão relacionadas à formação de testículos. O pirarucu (*Arapaima gigas*) é uma espécie sul-americana endêmica da bacia Amazônica, que durante os últimos anos vem sofrendo os efeitos negativos de sobrepesca devido ao seu alto valor comercial. O lambari (*Astyanax altiparanae*) é endêmico do território brasileiro, tido como um importante marcador biológico de poluição. O piapara (*Leporinus elongatus*) mostrou ser um modelo muito interessante para se estudar mecanismo de determinação sexual. Fragmentos do gene Dmrt1 foram clonados nas três espécies estudadas, e do gene Sox9 foram adquiridos fragmentos de lambari e piapara apenas. A análise filogenética das sequências de aminoácidos pelo método bootstrap N-J de Sox9 e Dmrt1 mostrou estar em concordância com os dados morfológicos da filogenia dessas espécies. Foi feito o acompanhamento do desenvolvimento gonadal por métodos de microscopia de luz de lambari, onde foi constatada a presença de células germinativas na região da futura gônada já no período de 5 dias após eclosão (dae), sendo também observado que a formação de ovário ocorre primeiro do que a formação de testículo. Ainda em lambari, foi feita a análise do perfil de expressão dos genes Sox9 e Dmrt1 nos diferentes tecidos de machos e fêmeas, e também durante o desenvolvimento desta espécie utilizando o método de qRT-PCR. A expressão de ambos os genes mostram uma especificidade para testículo em comparação com o ovário, indicando que possivelmente estes genes ainda possuem nos adultos uma função macho-específica. Nas larvas de lambari, os genes foram expressos em todos os períodos larvais, tendo uma diminuição no estágio de 12 dae, e aumentando sua expressão no estágio de 33 dae. Os resultados encontrados neste trabalho podem ajudar a complementar as informações sobre a filogenia das espécies sul-americanas, assim como entender melhor os mecanismos moleculares de determinação sexual destas espécies, cujos estudos são muito escassos na literatura.

Palavras-Chave: Teleósteos. Gene Dmrt1. Gene Sox9. Desenvolvimento gonadal

ABSTRACT

ADOLFI, M. C. **Gonadal development and molecular cloning of Dmrt1 (doublesex and mab-3-related transcription factor-1) and Sox9 in South American teleosts**. 2011. 74f. [Master thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

In this work, we analyzed the sequences of Dmrt1 and Sox9 genes, whose functions are related to the formation of testes, in three South American teleost species using molecular cloning techniques. The pirarucu (*Arapaima gigas*) is a South American species endemic to the Amazon basin, which has been suffering overfishing due its high commercial value. The lambari (*Astyanax altiparanae*) is endemic to Brazil, and may become as an important biomarker of pollution. The piapara (*Leporinus elongatus*) proved to be a very interesting model to study mechanism of sex determination. Fragments of Dmrt1 gene were cloned in these three species, and Sox9 gene fragments have been acquired only for lambari and piapara. Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequences of Dmrt1 and Sox9 by bootstrap N-J was shown to be consistent with the morphological phylogeny of these species. This analysis was followed by study of the gonadal development by light microscopy in lambari, where it was found the presence of germ cells in the region of the future gonad in 5 days after hatching (dah), and that the formation of ovaries occurs first comparing to the formation of testis. Lambari has showed the gene expression Sox9 and Dmrt1 in different tissues of males and females, and also during the development of this species by the method of qRT-PCR. The expression of both genes show a specificity for testis comparing to ovary, which indicates that these genes also have a male-specific role in the adult. In larvae of lambari, the genes were expressed in all larval periods, with a decrease of expression levels in 12 dah, and increasing its expression at stage of 33 dae. The findings of this study can help to increase the knowledge about the phylogeny of South American species, as well as better understand the molecular mechanisms of sex determination of these species, whose studies are very scarce in the literature.

Keywords: Teleostei. Dmrt1 gene. Sox9 gene. Gonadal development

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cladograma das ordens de Actinopterygii	3
Figura 2 - Esquema comparativo das cascatas de determinação sexual de mamíferos e medaka	12
Figura 3 - Juvenil de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	16
Figura 4 - Macho adulto de lambari-do-rabo-amarelo (<i>Astyanax altiparanae</i>)	17
Figura 5 - Macho adulto de piapara (<i>Leporinus elongatus</i>)	17
Figura 6 - Estrutura do gene dmrt1	30
Figura 7 - Árvore filogenética de DMRT1 de vertebrados	31
Figura 8 - Estrutura do gene sox9	32
Figura 9 - Árvore filogenética do grupo de proteínas Sox E de vertebrados	33
Figura 10 - Corte histológico de gônadas de lambari, piapara e pirarucu	34
Figura 11 - Aspecto macroscópico de larvas de <i>A. altiparanae</i> durante o desenvolvimento inicial	35
Figura 12 - Desenvolvimento gonadal em larvas de <i>A. altiparanae</i>	36
Figura 13 - Diferenciação sexual de alevinos de <i>A. altiparanae</i>	37
Figura 14 - Expressão de dmrt1 e sox9 em larvas de lambari em diferentes períodos do desenvolvimento	38
Figura 15 - Expressão de dmrt1 e sox9 em lambaris adultos em diferentes tecidos	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diversidade de teleósteos	4
Tabela 2 - Sequência dos <i>primers</i> e para qual propósito estes foram utilizados neste trabalho	24
Tabela 3 - Expressão dos genes <i>dmrt1</i> e <i>sox9</i> em tecidos de adultos machos, exceto ovário	44

LISTA DE SÍMBOLOS

AMINOÁCIDO

Ácido aspártico	D
Ácido glutâmico	E
Arginina	R
Asparagina	N
Glutamina	Q
Histidina	H
Lisina	K
Serina	S
Tirosina	Y
Treonina	T

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

DEGENERAÇÃO DAS BASES NITROGENADAS DOS PRIMERS

A,G	R
C,T	Y
A,C	M
G,T	K
C,G	S
A,T	W
A,C,T	H
C,G,T	B
A,C,G	V
A,G,T	D
A,C,G,T	N

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Biologia reprodutiva de teleósteos	1
1.2 Desenvolvimento gonadal	5
1.3 Controle molecular da diferenciação sexual	8
1.4 Animais Experimentais	15
1.4.1 Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	15
1.4.2 Lambari (<i>Astyanax altiparanae</i>)	16
1.4.3 Piapara (<i>Leporinus elongatus</i>)	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos gerais	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.1.1 <i>Arapaima gigas</i>	19
3.1.2 <i>Astyanax altiparanae</i>	19
3.1.3 <i>Leporinus elongatus</i>	20
3.2 Fixação do material	20
3.3 Cloanagem molecular de <i>dmrt1</i> e <i>sox9</i>	20
3.3.1 Purificação do RNA total	20
3.3.2 Síntese do cDNA fita dupla	21
3.3.3 PCR para amplificação dos fragmentos de cDNA	21
3.4 Análise das sequências	22
3.5 Análise dos padrões de expressão por qRT-PCR	23
3.6 Histologia	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Clonagem molecular de <i>dmrt1</i> e <i>sox9</i>	26
4.2 Morfologia das gônadas dos animais experimentais	27
4.3 Desenvolvimento gonadal em lambari	28
4.4 Análise do padrão de expressão por qRT-PCR em <i>Astyanax altiparanae</i>	28
5 DISCUSSÃO	40
5.1 Sequências de <i>dmrt1</i> e <i>sox9</i> em pirarucu, lambari e piapara	40

5.2 Expressão de <i>dmrt1</i> e <i>sox9</i>, e o desenvolvimento gonadal em lambari	44
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia reprodutiva de teleósteos

O grupo dos teleósteos, baseado no número de espécies e indivíduos, é a principal linhagem na evolução dos peixes. O grupo contém 40 ordens, 448 famílias, e 26.840 espécies (NELSON, 2006) (Figura 1). É um grupo bem sucedido devido às inúmeras adaptações que aperfeiçoaram a respiração, alimentação, flutuabilidade, natação, e reprodução. O grupo é definido pela cauda homocerca; Tele-ostei significa “final-osso” referindo-se aos ossos especializados (uroneural) no final da coluna vertebral que sustenta a nadadeira caudal simétrica (MOYLE, CECH, 2004). Apesar do monofiletismo do grupo ter suporte nas características morfológicas, são necessárias evidências moleculares convincentes que estejam de acordo com tais características. Existem, contudo, alguns desacordos na caracterização de telósteos quando são considerados alguns grupos fósseis (NELSON, 2006).

O Brasil se destaca pela riqueza e diversidade de sua fauna de peixes onde tem registrada a presença de mais de 2.500 espécies pertencentes a famílias de peixes que ocorrem exclusivamente em ambiente de água doce. Este elevado número de espécies reflete uma grande diversidade existente nas bacias hidrográficas tropicais e subtropicais da Região Neotropical, e um significativo aumento do conhecimento sobre a ictiofauna brasileira (BUCKUP et al., 2007) (Tabela 1).

O sucesso de qualquer espécie de peixe é determinado pelas habilidades em reproduzir com sucesso em ambientes flutuantes, e desta forma manter a viabilidade populacional. Visto que cada espécie de peixe vive em condições ecológicas únicas, são necessárias estratégias reprodutivas específicas, com especializações de anatomia, comportamento, fisiologia, e adaptações energéticas (MOYLE, CECH, 2004).

Usualmente divide-se a história de vida dos peixes em cinco períodos maiores do desenvolvimento: embrionário, larval, juvenil, adulto e senescente (BALON, 1975). O período embrionário é aquele no qual o indivíduo em desenvolvimento é completamente dependente da nutrição de providência materna, pelo vitelo do ovo ou por conexões diretas com uma estrutura semelhante a uma placenta (em peixes vivíparos). Geralmente o ovo é uma estrutura redonda e transparente, podendo

variar em formato e tamanho. A estrutura básica do ovo consiste de uma camada externa (córion), um espaço perivitelínico interno, o embrião e o vitelo.

O início do período larval é caracterizado pela larva livre-natante com uma aparente habilidade de capturar alimento. Juvenis são reconhecidos por parecerem uma miniatura dos adultos, e este é o período de maior crescimento da vida dos peixes. No período adulto, os peixes apresentam comportamento reprodutivo com o desenvolvimento de estruturas reprodutivas. O período senescente é caracterizado pela interrupção do crescimento e da produção, e geralmente com a não produção de gametas (MOYLE, CECH, 2004).

Normalmente o comportamento reprodutivo é tratado como se todas as espécies apresentassem dois sexos bem definidos e razão 1:1 dos sexos em uma população, porém estratégias reprodutivas alternativas são encontradas em peixes. Dentro dessas alternativas encontram-se hermafroditismo, partenogênese e hibridogênese. O hermafroditismo pode ser *sincrônico*, onde o indivíduo possui ambos tecidos de ovários e testículos, ou *sequencial*, onde o indivíduo primeiro produz um tipo de gameta, em seguida ocorre reversão sexual e produz o outro tipo em um subsequente ciclo de desova. No hermafroditismo sequencial, o padrão mais comum é o de fêmea se diferencia em macho (protogínico), sendo menos comum o macho se diferenciando em fêmea (protândrico). Essa mudança de sexo pode ser influenciada pelo ambiente social e físico em que o peixe vive (DEVLIN, NAGAHAMA, 2002). A partenogênese é uma forma de reprodução assexuada, e ocorre em espécies onde todos os indivíduos são fêmeas. A hibridogênese é aquela em que ocorre o acasalamento entre uma fêmea e um macho hospedeiro que resulta na fertilização do ovo, e ocorre a formação de um híbrido. Contudo, durante a oogênese das fêmeas híbridas, o cromossomo que veio do macho hospedeiro é perdido na meiose, sendo que apenas os genes da fêmea são passados para as próximas gerações (MOYLE, CECH, 2004; DEVLIN, NAGAHAMA, 2002).

Figura 1 – Cladograma das ordens de Actinopterygii.

Notar que grande maioria das ordens pertence ao grupo dos teleósteos

Fonte: Adaptado de Nelson (2006)

Tabela 1 – Diversidade de teleósteos destacando o número de espécies de água doce.

Ordens	Famílias	Gêneros	Espécies	Espécies de água doce	Espécies que utilizam água doce
Osteoglossiformes	4	28	218	218	218
Elopiformes	2	2	8	0	7
Albuliformes	3	8	30	0	0
Anguilliformes	15	141	791	6	26
Saccopharyngiformes	4	5	28	0	0
Clupeiformes	5	84	364	79	85
Gonorynchiformes	4	7	37	31	32
Cypriniformes	6	321	3268	3268	3268
Characiformes	18	270	1674	1674	1674
Siluriformes	35	446	2867	2740	2750
Gymnotiformes	5	30	134	134	134
Argentiniformes	6	57	202	0	0
Osmeriformes	3	22	88	82	86
Salmoniformes	1	11	66	45	66
Esociformes	2	4	10	10	10
Stomiiformes	5	53	391	0	0
Ateleopodiformes	1	4	12	0	0
Aulopiformes	15	44	236	0	0
Myctophiformes	2	35	246	0	0
Lampriformes	7	12	21	0	0
Polymixiiformes	1	1	10	0	0
Percopsiformes	3	7	9	9	9
Gadiformes	9	75	555	1	2
Ophidiiformes	5	100	385	5	6
Batrachoidiformes	1	22	78	6	7
Lophiiformes	18	66	313	0	0
Mugiliformes	1	17	72	1	7
Atheriniformes	6	48	312	210	240
Beloniformes	5	36	227	98	104
Cyprinodontiformes	10	109	1013	996	1008
Stephanoberyciformes	9	28	75	0	0
Beryciformes	7	29	144	0	0
Zeiformes	6	16	32	0	0
Gasterosteiformes	11	71	278	21	43
Synbranchiformes	3	15	99	96	99
Scorpaeniformes	26	279	1477	60	62
Perciformes	160	1539	10033	2040	2335
Pleuronectiformes	14	134	678	10	20
Tetraodontiformes	0	101	357	14	22

Fonte: Adaptado de Nelson (2006)

1.2 Desenvolvimento gonadal

A reprodução sexual é fundamental para manter a variação e permitir a sobrevivência das espécies, tendo a diferenciação gonadal como um evento fundamental para este processo. A diferenciação gonadal é um dos eventos mais rápidos na determinação sexual (MARIN, BAKER, 1998). Em vertebrados, a gônada diferencia-se em ovário ou testículo durante a ontogênese. A gônada indiferenciada é constituída de dois componentes de células somáticas: o córtex e a medula. O primeiro tem origem da parede do peritônio e o segundo deriva do blastema mesonéfrico. Na maioria dos vertebrados, durante a formação do ovário, o córtex se desenvolve e a medula degenera, porém, na formação testicular ocorre o inverso, sendo que a medula se desenvolve e o córtex degenera. Contudo, diferente de outros vertebrados, o tecido medular não é encontrado nas gônadas dos teleósteos, sendo a origem das células somáticas advinda do córtex (DEVLIN, NAGAHAMA, 2002).

Além de componentes somáticos, as gônadas tanto masculinas como femininas apresentam células germinativas, as quais darão origem aos gametas. A determinação da linhagem germinativa inicia-se logo nas primeiras clivagens do embrião e é independente do tecido gonadal, exceto em mamíferos. Todos os gametas têm origem a partir das células germinativas primordiais (PGC), e sua diferenciação se dá devido à presença de componentes citoplasmáticos formados a partir de clivagens específicas do embrião. Estes componentes citoplasmáticos apresentam proteínas específicas e mRNAs que coletivamente foram chamados de *plasma germinativo* (GILBERT, 2006). Em *zebrafish* foi visto que o plasma germinativo forma *nuages* caracterizadas por grânulos polares, mitocôndrias e concentrado de mRNAs, sendo dois destes mRNAs *Vasa* e *Nanos* (YOON et al. 1997).

Utilizando a mensagem de *Vasa* como marcador, Weidinger et al. (1999) detalharam a migração de quatro aglomerados de PGCs em *zebrafish*. Cada aglomerado segue uma rota diferente de migração, mas no final do primeiro dia de desenvolvimento, as PGCs são encontradas em dois grupamentos ao longo da borda do mesoderma truncal. De lá, elas migram posteriormente para as gônadas em desenvolvimento devido a estímulos quimioatrativos secretados pelo tecido gonadal em formação (RAZ, 2003).

Características sexuais e de desenvolvimento gonadal variam bastante dentro do grupo de peixes. Ambos os testículos de machos e os ovários de fêmeas são tipicamente estruturas pares que são suspensas pelo mesentério ao longo do teto da cavidade corporal, numa associação íntima com os rins (MOYLE, CECHE, 2004). Ambas apresentam-se desenvolvidas em indivíduos adultos, porém, em algumas espécies de peixes, as gônadas também podem ser únicas ou fundidas (TAYLOR, BURR, 1997).

Na maioria das espécies gonocóricas, a diferenciação gonadal ocorre a partir de uma gônada indiferenciada: estas foram designadas gonocóricas “diferenciadas”. As outras espécies, antes do final da diferenciação sexual, apresentam um hermafroditismo juvenil e rudimentar, caracterizado por gônadas imaturas com células germinativas de macho e de fêmeas: estas espécies são classificadas como gonocóricas “indiferenciadas” (GRANDI, COLOMBO, 1997; MEIJIDE et al., 2005). Além de animais gonocóricos, em peixes, existem tipos de hermafroditismos, incluindo protândricos, protogínicos e hermafroditismo sincrônico (NAKAMURA et al., 1998).

O padrão e o tempo da diferenciação gonadal e determinação sexual tem sido bem estudado em peixes (PATIÑO et al., 1996; STRÜSSMANN et al., 1996; GRANDI, COLOMBO, 1997; LIN et al., 1997; NAKAMURA et al., 1998; DEVLIN, NAGAHAMA, 2002). Na maioria das espécies de teleósteos, o ovário se desenvolve primeiro, e algumas semanas ou meses depois, ocorre a formação dos testículos (NAKAMURA et al., 1998; DEVLIN, NAGAHAMA, 2002). Foi visto que a gônada determinada a ser ovário apresenta maior número de células germinativas do que aquela que originará testículo, e a mitose e meiose destas células iniciam-se primeiro nos ovários e depois nos testículos (SATO, EGAMI, 1972; NAKAMURA et al., 1998; SAITO et al., 2007). Alterações nas células somáticas também podem ajudar no reconhecimento do sexo em peixes, onde se têm a formação do ducto eferente em machos em estágios mais iniciais (NAKAMURA, NAGAHAMA, 1989) e a formação da cavidade ovariana em fêmeas em estágios mais tardios (NAKAMURA, NAGAHAMA, 1985). Vizziano et al. (2007) observaram que os ovários em formação de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) se tornavam maiores que em testículos em desenvolvimento, e eram claramente distinguíveis pela presença da lamela ovariana, delimitada por tecido conjuntivo.

Em mamíferos, uma vez que o sexo foi determinado, segue-se um caminho único de desenvolvimento, produzindo testículos ou ovários totalmente diferenciados (CAPEL, 1998). Em peixes existem diversas exceções a esta regra, onde o desenvolvimento gonadal pode ser influenciado por flutuações de fatores intrínsecos como crescimento ou comportamento, ou por fatores extrínsecos ambientais como temperatura, exposição a hormônios ou poluição (PATIÑO et al., 1996; DEVLIN, NAGAHAMA, 2002). Também foi visto que o tratamento de peixes com hormônios pode induzir à reversão do desenvolvimento gonadal, não apenas em indivíduos com gônadas indiferenciadas, mas também em animais que já completaram o desenvolvimento das gônadas (KOOPMAN et al., 1991; ANDERSEN et al., 1996).

Devido à utilização de diversos hormônios para induzir o desenvolvimento ou reversão sexual, foi sugerido que hormônios sexuais atuariam como indutores endógenos durante a diferenciação sexual (YAMAMOTO, 1969). O controle endócrino da diferenciação sexual envolve uma complexa relação e conexão do encéfalo com as gônadas, através da produção de gonadotrofinas derivadas da hipófise e esteróides produzidos nas gônadas e no encéfalo. Porém, os hormônios mais investigados são os esteróides sexuais. 17 β -estradiol é encontrado em níveis maiores em fêmeas do que em machos, acreditando que este pode ser o responsável pela indução e manutenção do desenvolvimento ovariano. Tanto testosterona quanto 11-cetotestosterona são encontradas em altos níveis em machos, sendo o último o principal responsável pelo desenvolvimento testicular (DEVLIN, NAGAHAMA, 2002). Porém, a função de andrógeno na diferenciação para testículos ainda é controversa, devido à síntese de andrógeno nem sempre ser detectada antes da diferenciação testicular em peixes teleósteos (NAKAMURA et al. 1998; NAKAMURA et al. 2003).

Diversas enzimas são responsáveis pela biossíntese de esteróides em peixes. Uma destas enzimas tem ganhado bastante destaque que é a aromatase gonadal (P450 aromatase), cuja função é a conversão de testosterona em 17 β -estradiol (NAGAHAMA, 1994). Estudos com inibidores da aromatase resultaram na formação de fenótipo de machos em indivíduos geneticamente fêmeas (FENSKE, SEGNER 2004; VIZZIANO et al., 2008). Assim formou-se a hipótese de que a síntese de estrógeno é requerida para engatilhar o desenvolvimento de gônada feminina no embrião, e sua falta (com a inibição da expressão de aromatase) é

suficiente para levar ao desenvolvimento dos testículos (VIZZIANO-CANTONNET et al., 2008).

Além de hormônios esteróides, foi visto em espécies hermafroditas que gonadotrofinas promovem um aumento de testosterona em machos ou bissexuados, e de testosterona e estradiol em fêmeas (NAKAMURA et al., 1994). Porém, tratamento com LHRH em *S. aurata* não apresentou mudanças nos níveis de hormônios esteróides, contudo o tratamento levou sim a uma diminuição de tecido testicular na gônada (VILIA, CANARIO, 1995). Estes resultados sugerem um maior envolvimento de gonadotrofinas na transformação sexual de espécies protândricas.

As células produtoras de esteróides (SPCs) dos ovários e dos testículos (células de Leydig) apresentam distribuições características no órgão (NAGAHAMA, 1994). Em ovário maduro, as SPCs estão distribuídas extensivamente ao longo da área intersticial entre os oócitos (NAKAMURA et al., 1993). Em testículos maduros, células de Leydig, isoladas ou em grupos, se desenvolvem no interstício, entre os lóbulos (túbulos), geralmente próximas a vasos sanguíneos (GRIER et al., 1989). Nakamura (1998) mostrou em tilápia que as SPCs dos testículos e ovários em formação aparecem juntas temporariamente, e em torno do período de diferenciação sexual.

1.3 Controle molecular da diferenciação sexual

O processo molecular de determinação sexual ainda não está completamente elucidado. Em mamíferos, sabe-se que este processo envolve a ação regulatória de um gene ligado ao cromossomo Y, denominado SRY (CAPEL, 1998; TEMEL et al., 2007). Este gene inicia o desenvolvimento de testículos ao invés de ovários a partir do primórdio gonadal, sendo o único gene do cromossomo Y necessário para o desenvolvimento dos testículos (SWAIN, LOVELL-BADGE, 1999; CAPEL, 2000). Koopman et al. (1991) demonstraram que transgênicos de ratos XX que carregavam o gene Sry desenvolviam-se machos.

Em contraste com os diversos processos de desenvolvimento, os mecanismos genéticos de determinação sexual podem variar filogeneticamente (KOBAYASHI et al., 2008).

Estudos indicam a existência de alguns produtos de genes que levam à diferenciação gonadal que durante a evolução mantiveram as mesmas funções. Exemplo disto é uma família gênica descoberta em insetos (*doublesex*) e

nematóides (*mab-3*) que codificam proteínas com motivo, denominado “domínio DM”, com propriedade de ligação ao DNA, apresentando uma estrutura semelhante a um motivo *zinc-finger* (BURTIS, BAKER, 1989; SINCLAIR et al., 1990; RAYMOND et al., 1998). O gene *doublesex* ocupa posição chave na hierarquia de genes regulatórios da diferenciação sexual em *Drosophila*, sendo ele o único gene requerido para diferenciação sexual somática em ambos os sexos; todos os outros genes são requeridos apenas em fêmeas. Nenhum outro gene regulatório é requerido para diferenciação sexual somática em machos (BURTIS, BAKER, 1989). O gene *doublesex* (*DSX*), foi o primeiro gene da família DM que teve sua estrutura descrita. Ambos os sexos de *Drosophila* transcrevem *DSX*, porém, dependendo do sexo, ocorre um *splicing* alternativo do RNA que codificam para proteínas diferentes, o *DSX_m* específico de machos e o *DSX_f* específico de fêmeas. Em vertebrados mais derivados, é considerado que a via de diferenciação para fêmea ocorre quando existe uma falta de quaisquer fatores que induzam a diferenciação para macho (ex: SRY).

O gene DMRT1 (*doublesex/mab-3 related transcription factor-1*), que possui o domínio DM, parece ser o único gene que possui estrutura e função conservada na diferenciação e desenvolvimento gonadal em machos, e que já foi encontrado em mamíferos, aves, répteis, anfíbios, nematóides e moscas (RAYMOND et al., 1998; DE GRANDI et al., 2000; GUAN et al., 2000; MARCHAND et al., 2000; SHIBATA et al., 2002; LIU et al., 2007). Em anfíbios foi demonstrado que DMRT1 é expresso exclusivamente em gônadas de machos, e a aplicação de testosterona em fêmeas de *Rana rugosa* acaba induzindo à reversão sexual, assim como a expressão de DMRT1 nestes animais (SHIBATA et al., 2002). Em *Xenopus laevis*, que possui sistema ZZ/ZW de determinação sexual, foi isolado o gene DM-W (ligado ao W) de fêmeas, que é um parálogo do DMRT1 (YOSHIMOTO et al., 2008). Foi visto que possivelmente o DM-W e o DMRT1 possuem funções antagônicas nesta espécie, sendo o DM-W direcionando à formação de fêmeas e o DMRT1 à formação de machos (YOSHIMOTO et al., 2010).

Em répteis existem os mais variados sistemas de determinação sexual, sendo que nem todas as espécies possuem cromossomo sexual. Todas as cobras são semelhante às aves, onde as fêmeas são heterogamética e com um sistema ZZ/ZW. A maioria das tartarugas e todos os crocodilianos não possuem cromossomos sexuais, sendo o sexo determinado pela temperatura de incubação dos ovos. Em

geral, temperaturas maiores produzem machos em crocodilianos e fêmeas em tartarugas, porém esse padrão pode variar em algumas espécies de ambos os grupos (FERGUSON-SMITH, 2007). Kettlewell et al. (2000) observaram que a expressão de DMRT1 na crista genital em embriões de tartarugas é maior naqueles que foram incubados numa temperatura menor, que promove a formação de macho, do que naqueles incubados em maiores temperaturas, onde haveria a formação de fêmeas.

Em aves o melhor candidato gênico que leva à diferenciação sexual é o DMRT1, sendo este localizado no cromossomo Z. Este gene é expresso no embrião de ambos os sexos, porém em maior quantidade nos organismos machos (ZZ) em períodos mais críticos de diferenciação gonadal, quando a gônada indiferenciada começa a formar túbulos. Desta forma, pode-se inferir que a formação de machos em aves é dose-dependente de DMRT1, onde os organismos machos têm maior expressão do gene, e as fêmeas menor expressão do mesmo (RAYMOND et al., 1999). Foi visto também que genes ligados ao cromossomo W controlam a expressão de uma região hipermetilada do cromossomo Z próximo ao DMRT1, sugerindo que este mecanismo atua para reprimir a expressão de genes adjacentes ao DMRT1 em fêmeas ZW, promovendo o desenvolvimento do ovário (TERANISHI et al., 2001).

Em mamíferos, este gene é encontrado no braço curto de cromossomo 9p, sendo expresso nas células germinativas e de Sertoli, encontrando-se em uma posição *downstream* ao *sry* (RAYMOND et al., 1999). Em camundongos mutantes *Dmrt1*^{-/-}, além de apresentarem defeitos severos nos testículos, observaram-se anormalidades nas células de Sertoli, o que possivelmente explique a perda de células germinativas nestes animais. Sendo assim, DMRT1 de mamífero é necessário nas gônadas masculinas para a sobrevivência e diferenciação das células germinativas e somáticas (RAYMOND et al., 2000).

Em peixes, todas formas de determinação genética do sexo foram observadas, desde machos e fêmeas heterogaméticos com ou sem influência de *loci* autossômico, até sistemas sexuais mais complexos envolvendo diversos *loci*, mas sem cromossomo sexual (determinação sexual polifatorial), ou diversos cromossomos e vários pares de cromossomo (VOLFF et al., 2007). Em *Halichoeres tenuispinis*, que é uma espécie protogínica, há expressão de DMRT1 apenas nos testículos, mostrando fundamental importância deste gene em espécies

hermafroditas (JEONG et al., 2009). Em tilápias geneticamente fêmeas (XX) que sofreram reversão sexual com aplicação de andrógeno, foi induzida a expressão de DMRT1. Em tratamentos com estradiol em trutas macho (XY), houve uma redução da expressão de DMRT1 (GUAN et al., 2000; MARCHAND et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2008). Em *Silurus meridionalis* foi vista a existência de duas isoformas de *Dmrt1* (*Dmrt1a* e *Dmrt1b*), sendo *Dmrt1a* expresso exclusivamente em gônadas, porém em maior quantidade em testículos do que em ovários. O mesmo padrão de expressão foi observado para o *Dmrt1b*, porém além das gônadas, essa isoforma também foi expressa em outros tecidos como rim e intestino (LIU et al., 2007).

Em medaka, *Oryzias latipes*, o sistema de determinação sexual é aquele em que o macho é heterogamético (sistema XX-XY), como em mamífero, porém, como em várias espécies de peixes, os cromossomos sexuais não são diferenciados morfológicamente (MATSUDA, 2005). Foi localizado, na região de determinação sexual no cromossomo Y de medaka, um único gene que codifica uma proteína com um domínio DM. Este gene específico do cromossomo Y com o domínio DM foi nomeado de DMY ou *Dmrt1b(Y)*, onde sua origem parece ser de uma duplicação da região do DMRT1 autossômico (MATSUDA et al., 2002). Sua função tem sido amplamente estudada, estando envolvido no aprisionamento das células germinativas primordiais na mitose (PAUL-PRASANTH et al., 2006), e experimentos *in vitro* mostraram um aprisionamento em G2 (HERPIN et al., 2007). Mutantes para *Dmrt1bY* apresentaram reversão sexual devido à ausência do produto gênico (HORNUNG et al., 2007). A partir de estudos comparativos de camundongos *knockout* para *Dmrt1* com medakas também mutantes para este gene, foi possível traçar semelhanças nas funções de *Dmrt1* no desenvolvimento gonadal nestas duas classes distintas de animais (Figura 2) (HERPIN, SCHARTL, 2009).

Figura 2 - Esquema comparativo das cascatas de determinação sexual de mamíferos e medaka.

Uma visão comparativa do desenvolvimento gonadal de ambas as espécies, assim como o quanto estas são afetadas a partir da inativação e inibição de *Dmrt1*.

Fonte: Herpin, Schartl (2009).

Como dito anteriormente, fatores ambientais como temperatura também podem influenciar no processo de diferenciação sexual (DEVLIN, NAGAHAMA 2002). Porém, ao contrário do que se esperava, alguns experimentos mostraram que a temperatura também pode influenciar no sexo das espécies que apresentam determinação sexual restrita ao genótipo (BAROILLER et al., 1995; PATIÑO et al., 1996). Em trabalhos com medaka, foi visto que temperaturas altas de incubação de embriões durante períodos determinados podem levar à reversão sexual de animais geneticamente fêmea para machos funcionais, sendo o *Dmrt1* autossômico suficiente para cumprir tal função (HATTORI et al., 2007; SELIM et al., 2009). Isso indica que o gene *Dmrt1bY* em medaka pode ser tanto um fator forte para determinação sexual, como ao mesmo tempo fraco, pois pode ser prontamente substituído por fatores ambientais e genéticos alternativos (HATTORI et al., 2007).

Contudo, foi visto a existência de outros genes que estão relacionados à diferenciação sexual em vertebrados, e que podem estar relacionados à regulação de *DMRT1* (LEI, HECKERT, 2002, 2004). Genes específicos envolvidos na biossíntese de esteróides são diferencialmente expressos nas células somáticas de testículos e ovários (NAKAMURA et al., 1998) e, sendo assim, podem também estar envolvidos na diferenciação sexual. Estudos *in vitro* (análise com promotor) e *in vivo* (transgênese e hibridização *in situ*) mostraram que a aromatase gonadal é um dos alvos do *Dmrt1*. *Dmrt1* inibe a formação de fêmeas reprimindo o gene que transcreve a aromatase (*Cyp19a1a*) e, portanto, a produção de estrógenos nas gônadas de tilápia, e possivelmente em outros vertebrados (WANG et al., 2010).

Foi visto que membros da família Sox têm mostrado relação com a formação das gônadas. Esses codificam para um fator de transcrição que possui um motivo de ligação ao DNA, denominado SRY-like HMG (NAKAMOTO et al., 2005). Analisando a região promotora do gene *dmrt1*, foi possível identificar regiões onde alguns fatores de transcrição podem se ligar, sendo um deles o Sox5 atuando como um inibidor de *DMRT1* (GAO, et al., 2005). Ainda na região promotora do *dmrt1*, também foram encontrados sítios de ligação para o fator de transcrição GATA (ZHOU, GUI, 2010). O *zinc-finger transcription factors GATA binding proteins 4* (*GATA4*) está associado com a regulação da expressão de *DMRT1* especificamente na célula de Sertoli (LEI, HECKERT, 2004).

Em mamíferos, o Sox9 possui função essencial na determinação de testículo, sendo expresso na célula de Sertoli, e na formação de cartilagem (HEALY et al., 1999; WILHELM et al., 2007; JAKUBICZKA et al., 2010). Este gene parece ser o principal alvo do SRY, apresentando co-localização entre SOX9 e SRY nas células precursoras de Sertoli de camundongo. Sekido, Lovell-Badge (2008) mostraram que o SRY e o SOX9 podem ativar diretamente um *enhancer* de 1.3 kb localizado 13 kb *upstream* ao sítio de origem de transcrição do gene Sox9 de camundongo, chamado de *testis-specific enhancer of Sox9 core* (TESCO). Mutações no gene Sox9 XY podem levar a má formação do esqueleto, a disgênese gonadal, e a reversão sexual (BARRIONUEVO et al., 2006; GEORG et al., 2010; JAKUBICZKA et al., 2010). Já em camundongos XX transgênicos, a expressão de Sox9 na gônada pode levar à formação de testículo ao invés de ovário, mostrando que o Sox9 pode ser o único gene *downstream* ao SRY necessário para iniciar a via de diferenciação para macho em mamífero (VIDAL et al., 2001).

Foi visto que o gene Sox9 é conservado entre os demais grupos de animais, sendo ele encontrado em mamíferos, aves, anfíbios, peixes e insetos (DENNY et al., 1992; CORRIAT et al., 1993; ZHOU et al., 2002). Em peixes teleósteos, foi visto que este gene parece possuir estrutura e função conservada, e já foram descritas duas isoformas (*sox9a* e *sox9b*), onde em *zebrafish* a isoforma *sox9a* é expressa nas células de Sertoli, na periferia dos cistos nos testículos de machos adultos, e *sox9b* é expressa apenas em ovário e não em testículo (CHIANG et al., 2001). Já em adulto de medaka, *sox9a* é expresso preferencialmente no cérebro e ovário, e *sox9b* é mais forte em testículo que ovário, além de ser detectado no coração e baço (KLÜVER et al., 2005). Também foi identificada uma alta expressão de *sox9b* nas células somáticas do epitélio germinativo que envolvem as células tronco germinativas em ovário de adultos de medaka (NAKAMURA, 2010).

Ainda não se sabe como o Sox9 estaria agindo diretamente na diferenciação sexual em peixes, pois apesar da ampla distribuição deste gene dentro do grupo de peixes, pouco foi investigado. Foi visto em *zebrafish* que a isoforma *sox9a* apresenta um pico de expressão no período de diferenciação gonadal para macho, onde o ovário se transforma em testículo (JØRGENSEN et al., 2008).

1.4 Animais Experimentais

1.4.1 Pirarucu (*Arapaima gigas*)

Arapaima gigas, conhecido como pirarucu no Brasil e *paiche* no Peru, pertence à ordem Osteoglossiformes classificada como subdivisão Osteoglossomorpha, grupo este menos derivado dentro dos teleósteos. Algumas divergências têm surgido nos últimos anos em classificar a qual família pertence o pirarucu. Nelson (2006) classifica esta espécie como pertencente à família Osteoglossidae dentro da subfamília Heterotinae; contudo Ferraris (2003) coloca essa espécie dentro de uma família separada, classificada como Arapaimatidae, composta pelas mesmas duas espécies que compunham a antiga subfamília Heteronae (*Arapaima gigas* e *Heterotis niloticus*).

O pirarucu é considerado um dos maiores peixes de água doce, sendo comum a existência de exemplares pesando 125 kg. Chega a atingir 200 kg de massa corporal e 2 a 3 m de comprimento. É uma espécie estritamente ictiófaga, alimentando-se exclusivamente de peixes (IMBIRIBA et al., 1996). O corpo é alongado e revestido por escamas grandes, duras, espessas e ásperas. Os exemplares adultos apresentam os caracteres sexuais secundários somente poucos dias antes e após a realização da desova. Segundo Fontenelle (1948), a maturação sexual é parcial, podendo ocorrer várias desovas durante o período de reprodução. O ovário é um órgão ímpar e está situado na cavidade abdominal, em posição látero-mediana esquerda (FLORES, 1980). O testículo adulto é também considerado um órgão ímpar, pois a funcionalidade se restringe ao testículo esquerdo, uma vez que o direito é atrofiado. O pirarucu apresenta dois aparelhos respiratórios, um representado pelas brânquias, para respiração aquática, e o outro pela bexiga natatória, que se comunica com o tubo digestivo e funciona como um pulmão (SILVA et al., 1995).

O pirarucu habita preferencialmente as regiões de lagos das Bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins, sendo localizado, também, nos sistemas Rupunumi e Essequibo nas Guianas. No estuário amazônico, o pirarucu é encontrado nas ilhas de Marajó, Mexiana e Caviana (IMBIRIBA et al., 1996). Seu hábitat são as águas tranquilas da Amazônia, não sendo encontrado nas zonas de fortes correntezas e nas águas ricas em sedimentos (BARD, IMBIRIBA, 1986).

Durante os últimos anos, o pirarucu vem sofrendo os efeitos negativos da sobrepesca, devido ao seu alto valor comercial. Ademais, essa situação é agravada pelo hábito gregário dos alevinos, pelo longo período de proteção à prole, e pela necessidade fisiológica de subir à superfície frequentemente para captar o ar, no exercício da respiração aérea (SILVA et al., 1995; IMBIRIBA et al., 1996).

Figura 3 - Juvenil de pirarucu (*Arapaima gigas*).

1.4.2 Lambari (*Astyanax altiparanae*)

O *Astyanax altiparanae* pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Characidae. Essa espécie neotropical apresenta grande importância ecológica, econômica e comercial, sendo amplamente distribuída ao longo da bacia do rio Paraná (SHIBATTA et al. 2002, ORSI et al. 2002). Esse animal é vulgarmente conhecido como lambari-do-rabo-amarelo, apresentando pequeno porte, servindo de alimento para peixes carnívoros maiores. Apresentam grande flexibilidade alimentar, ingerindo principalmente insetos e sementes (SHIBATTA et al. 2002).

Essa espécie, anteriormente identificada como *Astyanax bimaculatus*, foi descrita por Garutti, Britski (2000) como uma nova espécie. Os lambaris ou tambiús pertencem à subfamília Tetragonopterinae, e são estritamente de água doce. Na família Characidae, são os que apresentam o maior número de espécies, sendo o gênero *Astyanax* o mais comum no Estado de São Paulo (NOMURA, 1975).

Com relação ao período reprodutivo do lambari, existem algumas divergências na literatura consultada. Santos (1995) e Barbieri (1982) afirmaram que a primavera é o período reprodutivo desses animais. Por outro lado, Agostinho (1984) relatou que a desova provavelmente seja do tipo parcelada, ocorrendo de novembro a fevereiro.

Figura 4 - Macho adulto de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*).

1.4.3 Piapara (*Leporinus elongatus*)

A espécie *Leporinus elongatus*, conhecida popularmente como piapara no Brasil e *boga* na Argentina, pertence também à ordem Characiforme e à família Anostomidae, a qual compreende pelo menos 137 espécies, distribuídas em 20 gêneros. Essa família é caracterizada por apresentar diversos hábitos aquáticos, alimentando-se de detritos, insetos e vegetais como sementes. Essa espécie é amplamente distribuída ao longo das bacias dos rios São Francisco, Paraná e Prata (GARAVELLO, BRITSKI, 2003).

Dentro do gênero *Leporinus*, já foram descritas 7 espécies que possuem o sistema ZZ/ZW (GALETTI et al., 1981, 1995; GALETTI, FORESTI, 1986, 1987; MOLINA et al., 1998), onde a espécie *Leporinus elongatus* apresenta um sistema múltiplo ($Z_1Z_1Z_2Z_2:Z_1W_1Z_2W_2$), sendo esta espécie um modelo muito interessante para se estudar mecanismo de determinação sexual (PARISE-MALTEMPI et al., 2007).

Figura 5 - Macho adulto de piapara (*Leporinus elongatus*).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Através de ferramentas de morfologia e de biologia molecular, pretende-se descrever e comparar a estrutura e expressão de genes relacionados à diferenciação sexual de três espécies de teleósteos: o *Arapaima gigas*, pertencente ao grupo mais basal dos teleósteos, o *Astyanax altiparanae*, de ampla distribuição e fácil manipulação, e o *Leporinus elongatus* por possuir um sistema cromossomal múltiplo peculiar da espécie, e desta forma, compreender melhor a biologia reprodutiva destas três espécies.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar o transcrito do gene *dmrt1* (*doublesex and mab-3-related transcription factor-1*) de *Arapaima gigas*, *Astyanax altiparanae* e *Leporinus elongatus*.
- Clonar o transcrito do gene *sox9* de *Arapaima gigas*, *Astyanax altiparanae* e *Leporinus elongatus*.
- Analisar o perfil de expressão dos genes *dmrt1* e *sox9*, nos diferentes tecidos de machos e fêmeas de *Astyanax altiparanae* e *Leporinus elongatus*.
- Acompanhar a formação e diferenciação das gônadas de *Astyanax altiparanae* em diferentes estágios de desenvolvimento larval por microscopia óptica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB, USP, nº. 57 - 2009.

3.1 Animais

3.1.1. *Arapaima gigas*

Alevinos de pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) foram obtidos em piscicultura situada no município de Sertãozinho (Estado de São Paulo, Brasil). Os animais foram mantidos até o período adulto no Centro de Aquicultura da UNESP (município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil). Dois espécimes de alevinos de aproximadamente 5 meses e dois espécimes de juvenis com um ano e meio foram anestesiados com 0,1% de benzocaína e em seguida, sacrificados por decapitação, tendo os tecidos rapidamente removidos.

3.1.2 *Astyanax altiparanae*

Machos e fêmeas adultos de lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* (Garutti, Britski, 2000) foram coletados no município de Salto Grande, Estado de São Paulo, Brasil. Larvas e alevinos foram coletados na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, situada junto à Usina Hidrelétrica Paraibuna da CESP (Companhia Energética de São Paulo) no município de Paraibuna, Estado de São Paulo, Brasil. As larvas e alevinos foram mantidos em aquários no Laboratório de Endocrinologia de Peixes (USP).

Larvas e alevinos foram coletados periodicamente em intervalos de 7 dias, a partir do 5º dia após eclosão (dae) para as larvas, e do 51º dae para os alevinos. Adultos e alevinos foram anestesiados com 0,1% de benzocaína e em seguida, sacrificados por decapitação, tendo os tecidos rapidamente removidos.

Para as análises de expressão gênica por qRT-PCR tecido-específica, os tecidos fígado, brânquia, músculo, rim, gônada, coração e intestino de indivíduos adultos foram coletados e mantidos em RNA *holder*. Foram coletadas também 10 gônadas de alevinos, para os períodos de 58 dae e de 73 dae e feito um *pool* de tecidos para extração de RNA, e mantidos também em RNA *holder*. As larvas que

tiveram os níveis de expressão analisados foram dos períodos de 5, 12, 19, 26 e 33 dae.

3.1.3 *Leporinus elongatus*

Machos e fêmeas adultos de piapara *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1850) foram coletados no município de Salto Grande, Estado de São Paulo, Brasil. Dez espécimes de cada sexo foram anestesiados com 0,1% de benzocaína e em seguida, sacrificados por decapitação, tendo os tecidos rapidamente removidos.

3.2 Fixação do material

Larvas inteiras de lambari e gônadas de adultos e alevinos de ambas as espécies foram imersas em solução de 4% glutaraldeído, Bouin ou Methacarn por pelo menos 24 horas, e mantidos em álcool 70%. Amostras destinada à extração de RNA total foram congeladas em RNA *holder* (BioAgency) até o procedimento de extração de RNA total.

3.3 Clonagem molecular de DMRT1 e Sox9

Os experimentos de clonagem foram desenvolvidos no laboratório de Biologia Celular e Molecular e NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular) coordenados pela professora Dra. Mari Cleide Sogayar no Departamento de Bioquímica, IQ, USP, com o auxílio e supervisão da pós-doutoranda Ana Cláudia Oliveira Carreira. O isolamento e sequenciamento do gene Sox9 foram desenvolvidos no laboratório do professor Manfred Scharf no Departamento de Química-Fisiológica I, Universidade de Würzburg, Alemanha.

3.3.1 Purificação do RNA total

Os RNAs totais dos tecidos de pirarucu e lambari foram extraídos a partir de um macerado de porções dos tecidos (congelados na presença de nitrogênio líquido e maceramento manual em cadinho de porcelana) utilizando-se o *kit* de extração de *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen®) segundo as recomendações do fabricante. A integridade do material foi averiguada através de eletroforese e coloração com brometo de etídeo e, também, da mensuração da razão Abs260/Abs280 no aparelho

Nanodrop™ Spectrophotometer (ND-1000). Foram utilizadas apenas amostras com razão Abs260/Abs280nm > 1.8.

3.3.2 Síntese de cDNA Fita Dupla

O RNA total extraído, como descrito no item anterior, foi previamente tratado com DNase I (1U/μL, Fermentas) e, então, utilizado como molde para a síntese de cDNA em uma reação de transcrição reversa, com *random primers* (Invitrogen), oligo-dT₁₈ (Fermentas) e a transcriptase reversa *Super Script III* (Invitrogen).

3.3.3 PCR para Amplificação dos Fragmentos de cDNA

Usando o cDNA como molde, *primers* degenerados ou *primers* genes-específicos foram adicionados às reações de PCR. Os *primers* foram desenhados usando como molde as regiões conservadas de Dmrt1 e Sox9 em diversos organismos.

Foram utilizados os seguintes reagentes para cada reação de amplificação dos fragmentos de cDNA relativos aos genes: 1X *High Fidelity Buffer* (Finzyme); 2 mM de dNTP (Fermentas); 1,0 μg de cDNA; 1U de *Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (Finzyme); *primers* específicos (0,5 μM *primer forward* e 0,5 μM *primer reverse*). Estas reações foram submetidas ao seguinte programa do termociclador PTC-225 Peltier Thermal Cycler® (MJ Research): 98 °C por 30 seg; 98 °C por 10 seg; temperatura de anelamento de acordo com o par de *primer* utilizado por 30 seg; 72 °C por 2 min (repetindo os passos 2, 3 e 4 por 34 vezes); 72 °C por 2 minutos para extensão final dos fragmentos e 4 °C por tempo indeterminado. Para verificar a amplificação dos fragmentos de interesse nos PCRs realizados, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1-2%, corado com brometo de etídeo em tampão 1X TAE (Tris-Acetato-EDTA). As amostras foram aplicadas com 1X tampão de amostra [10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol, 60% glicerol e 60 mM de EDTA]. Após o fracionamento, o gel foi fotodocumentado com o auxílio de luz ultravioleta.

Os fragmentos de interesse no peso molecular esperado foram recortados do gel com o auxílio de uma lâmina, em luz UV. As bandas extraídas foram purificadas utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado no

espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* para a reação de ligação com o vetor de sub-clonagem.

Os fragmentos obtidos nos tamanhos esperados foram sub-clonados em vetor pGEM[®]-T Easy (Promega), através de reações com T4 DNA Ligase (Kit *pGEM[®] T-Easy Vector System*, Promega). Bactérias competentes *E. coli* XL-1 foram transformadas por eletroporação com as construções plasmideais contendo o vetor pGEM[®]-T Easy e os fragmentos obtidos na amplificação. Clones bacterianos para cada uma das construções foram selecionados para verificar a presença do inserto de interesse por PCR de colônia. A presença e a sequência dos genes DMRT1 foram avaliadas por sequenciamento de DNA no aparelho ABI3700 (Perkin Elmer).

Em seguida, 5'- e 3'- RACE foram realizados utilizando *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen) e *3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen), de acordo com as instruções dos fabricantes e utilizando os *primers* projetados de acordo com as sequências de fragmentos de cDNA clonados. Após o sequenciamento dos produtos do RACE, *primers* foram projetados nas regiões não codificadoras (UTR) e usados para amplificar toda região codificadora da fita simples de cDNA da gônada. Os produtos foram em seguida sequenciados novamente para confirmar suas sequências de DNA.

3.4 Análises das sequências

O alinhamento das sequências de nucleotídeos e a dedução das suas sequências de aminoácidos foram realizados utilizando o software de alinhamento ClustalX. Clustal X também foi empregado para calcular e desenhar árvores filogenéticas utilizando o método N-J. Todas as sequências de nucleotídeos e aminoácidos que foram usadas nas análises filogenéticas foram obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O número de acesso do GenBank das sequências utilizadas são as seguintes: Dmrt1: *Silurus meridionalis* (EF015487), *Clarias gariepinus* (AF439561), *Danio rerio* (NM_205628.1), *Acipenser transmontanus* (AY057061), *Tetraodon nigroviridis* (AY152820), *Takifugu rubripes* (NM_001037949), *Odontesthes bonariensis* (AY319416), *Xiphophorus maculatus* (AF529187), *Oryzias latipes* (AF319994), *Oncorhynchus mykiss* (AF209095), *Oreochromis niloticus* (AF203489), *Acanthopagrus schlegelii* (AY323953), *Homo sapiens* (AF130728), *Mus*

musculus (NM_015826), *Canis familiaris* (XM_846402), *Gallus gallus* (AF123456), *Pelodiscus sinensis* (AB179697); Sox9: *Danio rerio* a (NM_131643.1), *Danio rerio* b (NM_131644.1), *Takifugu rubripes* a (AY277964.1), *Takifugu rubripes* b (AY277965.1), *Monopterus albus* a1 (AF378150.1), *Monopterus albus* a2 (AF378151.1), *Oryzias latipes* a (AY870394.1), *Oryzias latipes* b (AY870393.1), *Oncorhynchus mykiss* (AB006448.1), *Oncorhynchus mykiss* alpha2 (AF209872.1), *Oreochromis niloticus* a (DQ632574.1), *Oreochromis niloticus* b (DQ632575.1), *Gasterosteus aculeatus* (AY351914.1), *Mus musculus* (AF421878.1), *Gallus gallus* (U12533.1).

3.5 Análise do padrão de expressão por qRT- PCR

A expressão dos genes *dmrt1* e *sox9* de *Astyanax altiparanae* foram analisadas no *Applied Biosystems 7300 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). Os *primers* usados na amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados com o auxílio do programa computacional *Primer Express* versão 2.0 (*Applied Biosystems*), respeitando as seguintes especificações: amplificar fragmentos cujo tamanho varie entre 50-150bp, apresentar quantidade de citosina e guanina entre 30 e 80%, não apresentar a capacidade de formar dímero ou de estrutura secundária, apresentar temperatura de anelamento entre 58 °C e 60 °C de acordo com o algoritmo *nearest neighbor*. Para a quantificação do produto formado durante a reação de qRT-PCR foi utilizado o reagente SYBR® Green Dye (*Applied Biosystems*). A reação final de PCR contém: 3 µL de cada *primer* (0.4 mM); 6 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*); e 3 µL de cDNA sintentizado a partir de uma quantidade padronizada de RNA total (2 µg). Todas as reações de quantificações foram submetidas aos ciclos: 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min , e por fim 95 °C por 15 s. A análise da curva de *melting* foi aplicada em todas as reações para verificar a homogeneidade dos produtos das reações. O controle da reação através da exclusão do cDNA foi feita para averiguar possíveis contaminações. Curvas de diluição geradas por uma série de diluições de cDNA foram utilizadas para calcular a eficiência dos *primers* na amplificação. Os níveis de transcrição dos genes alvo foram normalizados utilizando o gene endógeno *elf a* (MCCURLEY, CALLARD, 2008).

Tabela 2 - Sequência dos *primers* e para qual propósito estes foram utilizados neste trabalho.

Primer	Sequência	Propósito
Dmrt1_dg-R	5'-GRGACAYGTTRTGGCTGGAC-3'	PCR de fragmento de cDNA
Dmrt1-F	5'-TGCAGAAACCAACGGCTTC-3'	PCR de fragmento de cDNA
Dmrt1-R	5'-GATGCCCATCTCCTCCTC-3'	PCR de fragmento de cDNA
Sox9_dg-F	5'-GGTGCTGAAGGGYTACGACT-3'	PCR de fragmento de cDNA
Sox9_dg-R	5'-GCYTTGAAGATGGCCTTGG-3'	PCR de fragmento de cDNA
Sox9_Lamb-F	5'-GGCTCGAGCAAGAGCAAG-3'	PCR de fragmento de cDNA
Sox9_Lamb-R	5'-GGCGTGGCTGTAAATAGGAGT-3'	PCR de fragmento de cDNA
Sox9_Lep-F	5'-GGCTCGAGCAAGAGCAAG-3'	PCR de fragmento de cDNA
Sox9_Lep-R	5'-CAGCAGCGTGGCTGTAGTAG-3'	PCR de fragmento de cDNA
Dmrt1_Lamb_RT - F	5'-CAGCCTACTACAGCAACCTCTACAAT-3'	Real-Time PCR
Dmrt1_Lamb_RT - R	5'-TGGCTGGACAGACGGCTATC-3'	Real-Time PCR
Dmrt1_Pira_RT - F	5'-TTCGTGTGCGCGCTCAA-3'	Real-Time PCR
Dmrt1_Pira_RT - R	5'-CGATGAGGCGACACTTGCT-3'	Real-Time PCR
Sox9_Lamb_RT - F	5'-CCAGCATGGGCGAAGTG-3'	Real-Time PCR
Sox9_Lamb_RT - R	5'-CGTAGGCGGGGTTTGA-3'	Real-Time PCR
Sox9_Lep_RT - F	5'-ACCAACGCCATCTTCAAAG-3'	Real-Time PCR
Sox9_Lep_RT - R	5'-GCCTGAATGGTCGGAGGGAGA-3'	Real-Time PCR
Elfa_RT - F	5'-CTTCTCAGGCTGACTGTGC-3'	Real-Time PCR endógeno
Elfa_RT - R	5'-CCGCTAGCATTACCTCC-3'	Real-Time PCR endógeno
Lamb_DM_5'G SP1 (1)	5'-TCTGTAAGTGGAGGGACT-3'	RACE
Lamb_DM_5'G SP2 (1)	5'-CAGGTGGCTCTGCGTGTCA-3'	RACE
Lamb_DM_5'G SP1 (2)	5'-AGATCAGTTTGCACTT-3'	RACE
Lamb_DM_5'G SP2 (2)	5'-ACTGGCAGTCCCTCCAGTTA-3'	RACE
Lamb_DM_3'G SP (1)	5'-CGAGGGAGAGCAAGCCGTGGT-3'	RACE
Lamb-Nested-G SP (1)	5'-AAGCGCTTGTGGCCCTTCAGC-3'	RACE
Lamb_DM_3'G SP1 (2)	5'-TCTGCAGCTTCTTACCTCAGC-3'	RACE
Lamb_Nested-G SP (2)	5'-AGAACAACGCCTGTCCTGAG-3'	RACE
Pira_DM_5'G SP1	5'-CAACTGGAAGGACTGTCA-3'	RACE
Pira_DM_5'G SP2	5'-CAACAGGCGCAGGAGGAGGA-3'	RACE
Pira_DM_3'G SP	5'-CGACGGCGATGAGGCGACAC-3'	RACE
Pira_Nested-G SP	5'-AGCGCTTGTGGCCCTTGAAGC-3'	RACE
Lamb_Sox9_5'G SP1	5'-GGCTGGTACTTGTAGT-3'	RACE
Lamb_Sox9_5'G SP2	5'-GCTTCTCACCTTCGTTGAGC-3'	RACE
Lamb_Sox9_3'G SP1	5'-TACAGCACTCGTCCTACCC-3'	RACE
Lamb_Sox9_3'G SP2	5'-AGTAAGACTACGCCGACAC-3'	RACE
Lep_Sox9_5'G SP1	5'-TCTTCACTGACTTCTC-3'	RACE
Lep_Sox9_5'G SP2	5'-CTCCACAGTTTGCCAGAGT-3'	RACE
Lep_Sox9_3'G SP1	5'-CCTAOGGTTCCTTCAACCTG-3'	RACE
Lep_Sox9_3'G SP2	5'-GCACTACAGCACCTCGTCCT-3'	RACE
β -Actin-F-Control	5'-CCATCTCTGCTCGAAGTC-3'	Controle interno
β -Actin-R-Control	5'-CACTGCCATCTACGAG-3'	Controle interno

3.6 Histologia

Todos os materiais coletados para histologia foram processados no Laboratório de Endocrinologia de Peixes, ICB - USP, seguindo o protocolo de rotina para histologia. A partir de então, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura em micrótomo comum, obtendo-se secções sagitais seriadas das larvas e das gônadas, as quais foram afixadas sobre lâminas de vidro contendo poli-L-lisina. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico comum (Zeiss Axioshop 2), e as imagens foram capturadas utilizando câmera digital (Pixera) acoplada a um computador.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem molecular de *dmrt1* e *sox9*

Foram realizadas amplificações utilizando *primers* degenerados para as diversas regiões do gene *dmrt1* e *sox9* de lambari, pirarucu e piapara. Os fragmentos obtidos foram analisados em gel de agarose para determinar o tamanho dos fragmentos. Após sub-clonagem dos fragmentos em vetor pGEM-T Easy e transformação dos plasmídeos em bactérias XL-1blue, foram realizados PCRs de colônia com os transformantes obtidos, e os produtos foram sequenciados. As sequências obtidas foram analisadas por alinhamento BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) comparadas com as sequências depositadas no *GenBank*.

Foram obtidos fragmentos correspondentes ao gene *dmrt1* para as três espécies (Figura 6). Um fragmento de 633 pb do gene *dmrt1* de lambari foi isolado, sendo visto que o mesmo codifica um peptídeo de 210 aminoácidos. Para essa espécie, todo domínio DM foi isolado, apresentando 63 aminoácidos, assim como todo domínio macho-específico teve sua sequência isolada, o qual contém 20 aminoácidos. Dos 202 aminoácidos do Dmrt1 de lambari, 21 aminoácidos pertencem ao domínio rico em P/S. Esse fragmento apresenta alta semelhança com outros peixes, como o bagre africano (83%) e a truta arco-íris (61%). Em pirarucu foi isolado um fragmento de 163 pb que codifica um peptídeo de 54 aminoácidos pertencente ao domínio DM. Esse fragmento, apesar de pequeno, apresentou alta identidade com *zebrafish* (97%) e com *Silurus meridionalis* (95%). Já em Piapara, até o momento foi conseguido um fragmento de 91 pb que codifica um peptídeo de 29 aminoácidos também pertencente ao domínio DM, e que apresenta 100% de identidade com bagre africano e *Silurus meridionalis*.

Em seguida, foi desenhada uma árvore filogenética da proteína DMRT1 de diversos grupos de animais comparando com os fragmentos isolados de *Astyanax altiparanae*, *Arapaima gigas* e *Leporinus elongatus* através do método *bootstrap* N-J utilizando a proteína DMRT2 de *fugu* (CAC42780) como grupo externo (Figura 7). A árvore mostra alta proximidade do lambari e piapara com o grupo dos teleósteos, e o pirarucu mais próximo ao esturjão, que é classificado como um actinoptérigeo basal.

O gene *sox9* teve um fragmento isolado para as espécies *A. altiparanae* e *L. elongatus* (Figura 8). Para lambari, foi obtido um fragmento de 1.103 pb de comprimento, e este codifica um peptídeo de 367 aminoácidos. Desta sequência de peptídeo, 79 aminoácidos pertencem ao domínio Sox9-HMG, e 64 aminoácidos pertencem ao domínio de transativação. Este último compartilha alta identidade com o bagre africano (78%), esturjão (73%) e truta arco-íris (76%). Já para piapara, foi isolado um fragmento de 1030 pb, e este codifica um peptídeo de 343 aminoácidos. Deste peptídeo, 79 aminoácidos pertencem ao domínio Sox9-HMG e 59 aminoácidos pertencem ao domínio de transativação. Este possui alta identidade com truta arco-íris (79%) e esturjão (76%).

A figura 8 mostra a alta homologia do domínio Sox9-HMG comparando as proteínas com outros clados. Em seguida, foi desenhada uma árvore filogenética da proteína SOX9 de diversos grupos de animais, comparando com os fragmentos isolados de *Astyanax altiparanae* e *Leporinus elongatus*, através do método *bootstrap* N-J, utilizando a proteína MATA1 de levedura (CAA24622.1) como grupo externo (Figura 9). Novamente, ambas espécies apresentaram alta proximidade com o grupo dos teleósteos, e também alta similaridade entre si. Comparando as sequências preditas do domínio HMG, o SOX9 de ambas espécies caem dentro da sub-família E das proteínas Sox, junto com SOX 8 e 10.

Com base nas sequências dos genes *dmrt1* e *sox9*, foram desenhados *primers* específicos para realizar as reações de qRT-PCR para *Astyanax altiparanae* (Tabela 2).

4.2 Morfologia das gônadas dos animais experimentais

Para a clonagem molecular, foram capturados indivíduos adultos de *A. altiparanae* e *L. elongatus*. Os fragmentos isolados dos genes relacionados com a diferenciação sexual para machos em pirarucu foram obtidos a partir da gônada imatura de *A. gigas*.

Os testículos de lambari apresentavam os tecidos com aparente desorganização, e com túbulos seminíferos com epitélio composto por células de Sertoli de forma cúbica, e pequena quantidade de espermatogônias, únicas células germinativas observadas. Em adição, o órgão apresentava uma grande quantidade

de tecido conjuntivo, aparentando ter sofrido total remodelamento tecidual (Figura 10A).

As gônadas dos alevinos de *Arapaima gigas* apresentaram células germinativas com um grande núcleo central arredondado, característico de gônia. O tecido também era formado por estruturas semelhantes a lamelas, caracterizadas pela divisão por tecido conjuntivo de partes de tecido gonadal periférico contendo nichos de células germinativas (Figura 10B).

Os testículos de piapara apresentavam túbulos repletos de espermatogônias isoladas ou circundadas por células de Sertoli e poucos cistos compostos por espermatócitos (Figura 10C).

Tanto os testículos de piapara como de lambari apresentavam túbulos seminíferos do tipo tubular anastomosado, onde próximo à túnica albugínea eles se ramificavam e se direcionavam ao ducto principal, onde os espermatozóides seriam liberados.

4.3 Desenvolvimento gonadal em lambari

Foram obtidas larvas de *Astyanax altiparanae* a partir do período de 5 dias após eclosão (dae) e mantidas até o período adulto (Figura 11). Desde os períodos de 5 dae foram observadas células semelhantes a células germinativas presentes ao longo do eixo ântero-posterior da crista genital, região esta onde se originariam as gônadas (Figuras 12A e 12B). Os alevinos apresentaram gônadas indiferenciadas até antes do período de 58 dae, quando ainda eram observadas células germinativas rodeadas por tecido gonadal indiferenciado (Figura 12C). A partir de 58 dae, foram encontrados os primeiros sinais de formação gonadal, onde apenas ovários foram observados e nenhum testículo foi encontrado (Figura 13A). A primeira vez que foi visto tecido testicular foi no período de 73 dae, porém, além de espermatogônias, este possuía alguns cistos em desenvolvimento, indicando que provavelmente o testículo já havia diferenciado um pouco antes da data de coleta (Figura 13B).

4.4 Análise do padrão de expressão por qRT-PCR em *Astyanax altiparanae*

Ao analisar o perfil de expressão gênica de *sox9* e *dmrt1* em um *pool* de gônadas de alevinos de lambaris nos períodos de 58 dae e 73 dae, foi possível observar que

ambos genes têm um aumento de até 4 vezes em 73 dae comparado ao 58 dae (Figura 13C). Esse resultado confirma as análises da morfologia, onde foi possível observar apenas a presença de tecido ovariano em 58 dae, sendo que, em 73 dae, foi então constatada a presença de testículo.

Nas larvas de lambaris, a expressão de *sox9* e *dmrt1* apresentam uma queda entre os períodos de 5 dae para 12 dae. Ambos os genes continuaram tendo baixa expressão até o período de 26 dae, e no período de 33 dae ocorreu um aumento significativo dos mesmos ($p < 0,05$).

Nos tecidos de animais adultos de *A. altiparanae* foi observada baixa expressão de *dmrt1* em tecidos de fêmeas, tendo o ovário a maior expressão. Já para machos, as maiores expressões foram detectadas em testículo e encéfalo, sendo o testículo o órgão com maior expressão em relação a todos os tecidos e a ambos os sexos com 190 vezes maior expressão do que no ovário.

Foi detectada a expressão do gene *sox9* em todos tecidos de machos e fêmeas. Foi ainda observada uma diferença significativamente maior na expressão de *sox9* em alguns tecidos de fêmeas em relação ao de machos, como encéfalo, intestino e brânquia ($p < 0,05$). Porém, comparando as gônadas, foi notada maior expressão em testículo do que em ovário ($p < 0,05$).

Figura 6 - Estrutura do gene *dmrt1*.

(A) Imagem da estrutura do gene *dmrt1*. (B) As regiões de alta homologia estão sublinhadas e indicadas por números romanos: I, domínio-DM; II, motivo específico de macho; III, região rica em P/S. Alinhamento dos aminoácidos de Dmrt1 de lambari, piapara e pirarucu com outros vertebrados. Os programas de computador CLUSTALX e Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) foram usados para análise.

Figura 7 – Árvore filogenética de DMRT1 em vertebrados.

A árvore foi enraizada utilizando o DMRT2 de fugu (CAC42780) como grupo externo. Os números em cada nó são os valores de *bootstraps*.

Figura 9 – Árvore filogenética do grupo de proteínas Sox E de vertebrados.

A árvore foi enraizada utilizando yeast-MATA1 (CAA24622.1) como grupo externo. Os números em cada nó são os valores de *bootstraps*.

Figura 10 – Corte histológico de gônadas de lambari, piapara e pirarucu.

Corte histológico de gônadas de lambari macho adulto; barra de escala = 100 μm (A), alevino de pirarucu; barra de escala = 50 μm (B) e piapara adulto macho; barra de escala = 50 μm (C). Go, gônia; SC, espermatócito; Se, célula de Sertoli; SG, espermatogônia.

Figura 11 - Aspecto macroscópico de larvas de *A.altiparanae* durante o desenvolvimento inicial

A – larva de 5 dias após eclosão (dae). B – Larva de 12 dae. C – Larva de 19 dae. D – Larva de 33 dae. E – Larva de 40 dae. F – Adulto. Escala: A a E (1 mm cada quadriculado).

Figura 12 - Desenvolvimento gonadal em larvas de *A.altiparanae*

(A) Fotografia de larva 5 dias após eclosão (dae); barra de escala = 1cm. (B) Vista longitudinal de larva 5 dae da região indicada pelo retângulo da figura 5A; barra de escala = 50 μ m. HE. (C) Gônada indiferenciada de juvenil de 40 dae; barra de escala = 20 μ m. HE. An, região anterior da larva; Go, gônia; Ps, região posterior da larva.

Figura 13 - Diferenciação sexual de alevinos de *A. altiparanae*.

(A) Ovário de juvenil de 58 dae; barra de escala = 50 μ m. HE. (B) Testículo de macho de 73 dae; barra de escala = 50 μ m. HE. (C) Expressão de *dmrt1* e *sox9* em alevinos de lambari. Os valores são unidades arbitrárias de expressão de ambos genes normalizados em relação aos níveis de *elf a* na mesma amostra. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) após teste t comparando os estágios de desenvolvimento. Oc, oócito; SC, espermátócito; Se, célula de Sertoli; SG, espermatogônia.

Figura 14 - Expressão de *dmrt1* e *sox9* em larvas de lambaris em diferentes períodos do desenvolvimento.

Os valores são unidades arbitrárias de expressão de ambos genes normalizados em relação aos níveis de *elf a* na mesma amostra. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) após teste t comparando dois períodos larvais consecutivos.

Figura 15 - Expressão de *dmrt1* (A) e *sox9* (B) em lambaris adultos em diferentes tecidos.

Os valores são unidades arbitrárias de expressão de ambos genes normalizados em relação aos níveis de *elf a* na mesma amostra. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) após teste t comparando tecidos de machos com os de fêmeas.

5 DISCUSSÃO

5.1 Sequências de *dmrt1* e *sox9* em pirarucu, lambari e piapara

Como os peixes apresentam alta diversidade de estratégias reprodutivas (CAPEL, 1998; MARIN, BAKER, 1998), estudos moleculares sobre o mecanismo de determinação sexual são importantes nestes animais, uma vez que tais mecanismos continuam parcialmente elucidados. Somado a isso, pouco se sabe sobre determinação sexual em espécies sul-americanas, sendo que o Brasil apresenta a maior diversidade de peixes de água doce do planeta. No presente estudo foram clonados fragmentos de genes *dmrt1* e *sox9*, relacionados à diferenciação sexual para machos, em três espécies diferentes de teleósteos da América do Sul, o pirarucu (*Arapaima gigas*), o lambari (*Astyanax altiparanae*) e o piapara (*Leporinus elongatus*).

Os vertebrados apresentam diversos sistemas cromossômicos que evoluíram de diferentes formas, influenciando de variadas maneiras os mecanismos de diferenciação sexual dentro deste grupo de animais. A hipótese do surgimento do gene “mestre” que levaria à diferenciação sexual é a da origem ser autossômica, onde dois diferentes alelos se desenvolveriam e que, se em homozigose, levariam à formação de um dos sexos e, se em heterozigose, ao outro sexo. Apesar de em mamíferos o *Sry*, presente no cromossomo sexual, possuir função principal de desencadear a diferenciação sexual, outros genes autossômicos que atuam *downstream* já foram identificados em outros vertebrados. O *Dmrt1* foi sugerido como sendo o ‘*Sry*’ dos não mamíferos, porém devido à grande variedade de mecanismos de diferenciação sexual, essa visão tem sofrido mudanças (SCHARTL, 2004).

O grupo de peixes, por apresentar uma alta diversidade de espécies e de estratégias reprodutivas, possui também grande variedade de sistemas cromossômicos. No caso de *Astyanax altiparanae* e *Arapaima gigas*, não foi descrita a presença de cromossomos sexuais, o que pode indicar que o ambiente pode agir diretamente na determinação sexual e na expressão de genes sexuais nestas espécies (FERNANDES, MARTINS-SANTOS, 2004). Contudo, para o gênero *Leporinus*, o sistema cromossômico ZZ/ZW já foi descrito em sete espécies diferentes. Em *L. elongatus* foram identificadas sequências repetitivas nos cromossomos sexuais e a presença de um sistema cromossômico múltiplo

$Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$. Esses dados somados indicam que possivelmente o sistema cromossomal de piapara ainda está passando por um processo evolutivo.

Em medaka, que possui cromossomo sexual (sistema XX/XY), a alta temperatura de incubação dos embriões pode induzir à reversão sexual de animais geneticamente fêmea em machos funcionais. Neste caso, apenas o *dmrt1* é suficiente para levar ao desenvolvimento de testículos, mostrando que, apesar da presença do cromossomo Y no macho, apenas o *dmrt1* autossômico tem função de diferenciação sexual. Sendo assim, a presença de um sistema cromossomal bem estabelecido, não necessariamente tira a importância primordial do *dmrt1* autossômico em levar a formação de macho em peixes (HATTORI et al., 2007; SELIM et al., 2009).

O gene *doublesex and mab-3 transcription factor 1* mostrou ser conservado ao longo da evolução sendo descrito em mamíferos, répteis, anfíbios, peixes e invertebrados (RAYMOND et al., 1998; DE GRANDI et al., 2000; GUAN et al., 2000; MARCHAND et al., 2000; SHIBATA et al., 2002; LIU et al., 2007). O *dmrt1* foi descrito como o principal gene na determinação sexual de diversos organismos, e sua alta similaridade reflete sua importância na diferenciação sexual (KOBAYASHI et al., 2008). Esse gene é caracterizado por conter um domínio semelhante a um dedo de zinco que se liga à fita de DNA, conhecido como domínio DM (BURTIS, BAKER, 1989; SINCLAIR et al., 1990; RAYMOND et al., 1998).

Ao analisarmos a estrutura dos aminoácidos do domínio DM e a árvore filogenética da proteína DMRT1 das três espécies estudadas, vimos que, apesar dos fragmentos pequenos de *A. gigas* e *L. elongatus*, o piapara localiza-se mais próximo ao grupo dos teleósteos, e o pirarucu mais próximo aos Actinopterygii basais, como o esturjão. Isso vai de encontro com dados morfológicos da posição basal do pirarucu dentro do grupo dos teleósteos (NELSON, 2006). Esses resultados sugerem que possivelmente o pirarucu possui um mecanismo de determinação semelhante ao de peixes ósseos menos derivados. Já o lambari tem a estrutura do domínio DM muito semelhante ao das espécies pertencente aos Ostariophysi, grupo este composto pelas ordens Characiformes (lambaris, piranha, dourado), Siluriformes (bagres, “peixes de couro”), Cypriniformes (carpas, *zebrafish*) e Gymnotiformes (peixes elétricos). O domínio variou apenas três aminoácidos do bagre africano, o que sugere mais uma vez a possível conservação de função desta proteína na determinação sexual de lambari. Desta forma, os resultados da análise da estrutura

do domínio DM do gene *dmrt1* das três espécies mostram a existência da conservação deste gene dentro do grupo dos teleósteos menos derivados (Characiformes e Osteoglossiformes), da mesma forma que mostram os dados morfológicos de filogenia do grupo (NELSON, 2006).

Adicionalmente, ao analisar a morfologia das gônadas dos animais que tiveram o domínio DM isolado, foi observado que em pirarucu, a gônada apresentava características típicas de ovário em desenvolvimento, sugerindo a existência de expressão de algum gene que possui o domínio DM em fêmea, como já foi demonstrado em truta arco-íris (MARCHAND et al. 2000).

Outra estrutura que caracteriza o gene *dmrt1* é a presença do domínio macho-específico. Em *Drosophila* foi observada a presença de dois tipos de genes DSX, um de macho (DSX^m) e um de fêmea (DSX^f), porém, em vertebrados basais como os peixes, foi sugerida a possível presença de um equivalente ao DSX^f de *Drosophila*. Ghan et al. (2000) isolou e analisou a expressão de um gene em tilápia que seria o equivalente ao DSX^f de *Drosophila*, que também pertencia a família DM, sendo chamado de *dmo* (DM-domain gene in Ovary). A estrutura que diferenciava primordialmente o *dmo* do *dmrt1* era a presença do domínio macho específico no *dmrt1*, que aparentemente é excluído por *splicing* alternativo. O domínio macho-específico é muito conservado dentro do grupo dos peixes, e já foi bem caracterizado em trabalhos de clonagem molecular de *dmrt1* (GUAN et al., 2000; LIU et al., 2007; JEONG et al., 2009). A clonagem molecular de *dmrt1* de lambari do presente trabalho fornece mais uma evidência da alta conservação desse domínio, uma vez que houve variação de apenas dois aminoácidos comparando-se com o bagre africano, mostrando também que o gene isolado era aquele relacionado com a diferenciação para machos.

Apenas uma isoforma de *dmrt1* foi isolada nas três espécies estudadas de teleósteos basais. Em alguns trabalhos foram descritas mais de uma isoforma de *dmrt1* em espécies de peixes (GUO et al., 2005; LIU et al., 2007). Liu et al. (2007) descreveu em *Silurus meridionales* duas isoformas proveniente de *splicing* alternativo do *dmrt1* (*dmrt1a* e *dmrt1b*), compartilhando o mesmo domínio DM. Os perfis de expressão gênica dessas isoformas são diferentes nos diferentes tecidos de machos e fêmeas. Devido à presença de outras isoformas de *dmrt1* em diferentes grupos de teleósteos menos derivados, é provável que estas existam nas

três espécies estudadas, porém, mais estudos são necessários para elucidar esta questão.

O gene *sox9* é outro gene relacionado com a determinação sexual e foi bem descrito em mamíferos, contudo esse gene também é importante para formação de cartilagem (HEALY et al., 1999; WILHELM et al., 2007; JAKUBICZKA et al., 2010). Esse gene também contém um motivo de ligação ao DNA conhecido como domínio HMG, o que é característico da família Sox (LAUDET et al., 1993; NAKAMOTO et al., 2005). Comparando o fragmento isolado do gene *sox9* de *A. altiparanae* e *L. elongatus* com outros membros da família Sox, é claramente observado que este pertence ao grupo do Sox9 para ambas as espécies. Pelo estudo da filogenia, a estrutura dos aminoácidos de SOX9 coloca ambas as espécies bem próximas, tendo como o grupo mais relacionado o do *zebrafish*. Esse resultado confirma também os dados morfológicos dos teleósteos basais agrupando os Ostariophysi, grupo ao qual pertencem o *zebrafish*, o lambari e o piapara (NELSON, 2006).

Outra característica estrutural da proteína SOX9 é a presença de um domínio de transativação na porção C-terminal. Esse domínio também é evolutivamente conservado, sendo rico em prolina, glutamina e serina. Foi visto que mutações no domínio de transativação causavam reversão sexual em pacientes que as possuíam, sugerindo que essas mutações provavelmente levavam a não transativação de genes *downstream* ao Sox9 em mamíferos (SÜDBECK et al., 1996). Ao analisar os fragmentos do domínio de transativação de ambas as espécies estudadas, foi visto que a estrutura apresenta-se altamente conservada, com variação apenas em três aminoácidos entre o lambari e o piapara.

Foi proposto que a duplicação de genes facilitou a evolução das funções dos genes, dando espaço para que os mecanismos de neofuncionalização e subfuncionalização ocorressem (POSTLETHWAIT et al., 2004). Famílias gênicas de humanos mostraram dois ciclos de duplicação no início da evolução dos vertebrados, e os genomas de peixes mostraram dois co-ortólogos de vários genes humanos, resultados de um terceiro ciclo de duplicação genômica que ocorreu na base da radiação dos teleósteos (DEHAL, BOORE, 2005). Cresko et al. (2003) descreveram que padrões de expressão combinadas de duas cópias do gene *sox9* em *zebrafish* correspondem a aproximadamente um único Sox9 de camundongo, indicativo de uma divisão ancestral de subfunções. Ao isolar o gene *sox9* de *A. altiparanae* e *L. elongatus*, apenas uma cópia foi encontrada para ambas as

espécies, sendo esta mais próxima da cópia *sox9a* de outras espécies de teleosteos. Em outras espécies, diferentes cópias de *sox9* foram encontradas. Em *M. albus* duas cópias de *sox9a* foram encontradas (*sox9a1* e *sox9a2*) (ZHOU et al., 2003). Apesar de ter sido isolada apenas uma cópia do gene *sox9* em lambari e piapara, é esperado que também exista pelo menos mais uma cópia deste gene em ambas as espécies.

5.2 Expressão de *dmrt1* e *sox9*, e o desenvolvimento gonadal em lambari

Foi visto que no grupo dos amniotas, a expressão de *dmrt1* se encontra restrita às gônadas, sendo maior em testículos quando comparada aos ovários. O momento do pico de expressão varia de acordo com a espécie, mas geralmente ocorre no período mais tardio da determinação, ou no início da diferenciação, estando envolvido no início da formação do testículo (KOOPMAN, LOFFLER, 2003). Isso vai de acordo com os resultados de expressão de *dmrt1* nas larvas onde, no período de 5 dae os níveis de expressão são maiores do que nos períodos de 12, 19 e 26 dae, havendo um outro pico aos 33 dae. Em *zebrafish* e medaka foi visto o primeiro pico de expressão de *dmrt1* nos primeiros dias após a eclosão (10 dae), sendo este gene em medaka o primeiro a ser diferencialmente expresso entre machos e fêmeas (KUROKAWA et al., 2007; JØRGENSEN et al., 2008).

Quanto à expressão diferencial nos tecidos de macho e fêmea de lambari, foi identificada expressão de *dmrt1* em outros tecidos além das gônadas, como em músculo e coração de machos, porém em outras espécies de peixes, aparentemente sua expressão estaria restrita às gônadas (VEITH et al., 2006; LIU et al., 2007; JØRGENSEN et al., 2008). Contudo, os dados de expressão observados em outros trabalhos foram obtidos por métodos semi-quantitativos (RT-PCR), menos sensíveis que o qRT-PCR, e provavelmente incapazes de detectar a expressão nos outros tecidos, os quais comparativamente têm expressão muito mais baixa em relação às gônadas (Tabela 3).

Tabela 3 - Expressão dos genes *dmrt1* e *sox9* em tecidos de adultos machos, exceto ovário.

	Fígado		Brânquia		Músculo		Coração		Rim		Intestino		Testículo		Encéfalo		Ovário	
	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>	<i>dmrt1</i>	<i>sox9</i>
<i>Astyanax altiparanae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+++	+++	++	++	+++	+	+
<i>Oryzias latipes</i> *	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	N.R.	+++	+++	-	++	-	-
<i>Danio rerio</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+++	++	-	++	+	-
<i>Clarias gariepinus</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+++	++	-	++	-	-

N.R., Não relatado

*Dados sobre *sox9b* de medaka

Foi proposto que o gene *dmrt1* é o principal fator de determinação sexual de vertebrados não mamíferos, porém essa idéia tem sido refutada, argumentando que talvez este gene tenha uma função posterior à determinação (SCHATTL, 2004). Foi visto que ele talvez atue mais diretamente na diferenciação e na manutenção do órgão, principalmente na diferenciação espermatogonial (KOBAYASHI et al., 2004; HERPIN et al., 2007).

A forma testicular do *sox9* é o gene *upstream* da cascata de diferenciação sexual mais conservado dentro do grupo dos vertebrados (Nakamoto et al., 2005). Por esse motivo, são importantes os estudos da expressão desse gene nos diferentes tecidos e durante a diferenciação e determinação sexual de lambari. Nossos resultados mostraram expressão de *sox9* em todos os tecidos analisados. Contudo é notada uma expressão macho-específica nas gônadas, padrão este também observado em *zebrafish* (CHIANG et al., 2001; JØRGENSEN et al., 2008). Contudo, foi observada maior expressão deste gene em intestino de ambos os sexos, resultado este incomum em peixes, assim como maior expressão em brânquia de fêmeas em relação aos machos.

Em galinha e em tartaruga *Lepidochelys olivacea* foi vista expressão de Sox9 nas gônadas indiferenciadas, tendo um aumento quando estas se diferenciavam em testículos, e sendo diminuída quando diferenciadas em ovários (DA SILVA et al., 1996; MORENO-MENDOZA et al., 1999). A função do *sox9* na diferenciação das gônadas de peixes continua incerta. Apesar da longa distribuição deste gene nas diversas espécies, pouco foi estudado. Em *zebrafish*, foi mostrado que o *sox9a* apresenta alta expressão no período esperado, no qual os ovários juvenis se transformariam em testículos (JØRGENSEN et al., 2008).

O padrão e o tempo de diferenciação gonadal e determinação sexual em peixes foram bem estudados (PATIÑO et al., 1996; STRÜSSMANN et al., 1996; GRANDI, COLOMBO, 1997; LIN et al., 1997; NAKAMURA et al., 1998; DEVLIN, NAGAHAMA, 2002). Durante o desenvolvimento do lambari, foi visto que o desenvolvimento gonadal se deu inicialmente em fêmea, e cerca de 2 semanas depois foi observada a presença de testículo para machos. Tais resultados vão de encontro, com o padrão observado na maioria dos teleósteos, onde o ovário se desenvolve primeiro e algumas semanas ou meses depois ocorre a formação de testículo (NAKAMURA et al., 1998; DEVLIN, NAGAHAMA, 2002). Porém, o testículo

de lambari foi encontrado com alguns cistos em estádios avançados de maturação, indicando que a formação do órgão ocorreu antes do período observado.

As imagens de histologia de larvas de *Astyanax altiparanae* revelaram que logo aos 5 dae, a linhagem germinativa já se encontrava junto ao tecido gonadal, indicando que a migração das células germinativas primordiais ocorre antes desse período. A origem das células germinativas ocorre independentemente do tecido gonadal, e durante o desenvolvimento do animal, as células migram para o trato genital (WEIDINGER et al., 1999; RAZ, 2003; GILBERT, 2006). O conhecimento da posição das células germinativas e o tempo de diferenciação sexual podem refletir os níveis de expressão de genes relacionados à diferenciação sexual. Ao analisar a expressão de *sox9* e *dmrt1* em gônadas de *A. altiparanae* durante os períodos nos quais foram observados ovários e testículos, foi obtido um aumento da expressão de ambos os genes. Esse resultado indica que, durante esse período, os genes relacionados à formação de testículo aumentam sua expressão direcionando a formação e a manutenção da gônada masculina.

6 CONCLUSÕES

- Os genes *dmrt1* e *sox9* isolados apresentaram suas sequências muito conservadas, principalmente os domínios característicos de cada gene.
- As análises filogenéticas dos aminoácidos dos genes estudados agruparam as espécies *A. gigas*, *A. altiparanae* e *L. elongatus* de maneira semelhante às análises morfológicas de filogenia.
- Durante a formação das gônadas de *A. altiparanae*, a diferenciação para ovários ocorre primeiro que em testículos.
- Os genes *dmrt1* e *sox9* em *A. altiparanae* mostram uma especificidade para testículo em comparação com ovário, indicando que possivelmente estes genes ainda possuem uma função macho-específica nos adultos.
- Nas larvas de lambari, os genes foram expressos em todos os períodos larvais, tendo uma diminuição no estágio de 12 dae, e aumentando sua expressão no estágios de 33 dae.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, C. A. Ciclo reprodutivo e primeira maturação de fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*) (L) (Osteichthyes - Characidae) do Rio Ivaí, Estado do Paraná. **Rev. Bras. Biol.**, v. 44, n. 1, p. 31-36, 1984.
- ANDERSEN, D.; BOETIUS, I.; LARSEN, L. O.; SEIDLER, P. H. Effects of oestradiol enrich diet and of feeding with porcine testicular tissue on macroscopic gonadal sex in European eels. **J. Fish Biol.**, v. 48, p. 484– 492, 1996.
- BALON, E. K. Terminology of intervals in fish development. **J. Fish. Res. Bd.**, v. 32, n. 9, p. 1663-1670, 1975.
- BARBIERI, G. Época de reprodução e peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 17, n.7, p. 1057-1065, 1982.
- BARD, J.; IMIBRIRA, E.P. Piscicultura do pirarucu (*Arapaima gigas*). **EMBRAPA, Circular técnico**, n. 52, p. 17, 1986.
- BAROILLER, J. F.; CHOURROUT, D.; FOSTIER, A.; JALABERT, B. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios on the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **J. Exp. Zool.**, v. 273, p. 216–223, 1995.
- BARRIONUEVO, F.; BAGHERI-FAM, S.; KLATTIG, J.; KIST, R.; TAKETO, M. M.; ENGLERT, C.; SCHERER, G. Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice. **Biol. Reprod.**, v. 74, p. 195–201, 2006.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. **Rio de Janeiro: Museu Nacional**, 2007. 195 p.
- BURTIS, K. C.; BAKER, B. S. *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex specific polypeptides. **Cell**, v. 56, p. 997-1010, 1989.
- CAPEL, B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. **Annu. Rev. Physiol.**, 60, 497– 523, 1998.
- CAPEL, B. The battle of the sexes. **Mech. Dev.**, v. 92, p. 89–103, 2000.
- CHIANG, E. F. L.; PAI, C. I.; WYATT, M.; YAN, Y. L.; POSTLETHWAIT, J., CHUNG., B. C. Two *Sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. **Dev. Biol.**, v. 231, p. 149-163, 2001.
- CORIAT, A. M.; MÜLLER, U.; HARRY, J. L.; UWANOGHO, D.; SHARPE, P. T. PCR Amplification of SRY-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the SRY-box motif. **Genome Res.**, v. 2, p. 218-222, 1993.

DE GRANDI, A.; CALVARI, V.; BERTINI, V.; BULFONE, A.; PEVERALI, G.; CAMERINO, G.; BORSANI, G.; GUIOLI, S. The expression pattern of a mouse *doublesex*-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. **Mech. Dev.**, v. 90, p. 323–326, 2000.

DENNY, P.; SWIFT, S.; BRAND, N.; DABHADE, N.; BARTON, P.; ASHWORTH, A. A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, n. 11, p. 2887, 1992.

DEVLIN, R.; NAGAHAMA Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p. 191-364, 2002.

FENSKE, M.; SEGNER, H. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Aquat. Toxicol.**, v. 67, p. 105–126, 2004.

FERGUSON-SMITH, M. The Evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of *DMRT1*. **Sex. Dev.**, v. 1, p. 2–11, 2007.

FERRARIS, JR., C. J. Arapaimatidae (Bonytongues). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. (eds). **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p 31-32.

FLORES, H. G. Desarrollo sexual del paiche (*Arapaima gigas* C.) en las zonas reservadas del estado (rios Pacaya y Samiria) 1971-1975. **Inf. Inst. Mar.**, v. 67, p. 1-14, 1980.

FONTENELLE, O. Contribuição para o conhecimento do pirarucu, *Arapaima gigas* (CUVIER), em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). **R. Bras. Biol.**, v. 8, n. 4, p. 455-459, 1948.

GALETTI, JR., P. M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW-system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). The role of constitutive heterochromatin. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 43, p. 43–46, 1986.

GALETTI, JR., P. M.; FORESTI, F. Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes) and their relationships in the phylogeny of the group. **Braz. J. Genet.**, v. 10, p. 135-140, 1987.

GALETTI, JR., P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Heteromorphic sex chromosomes in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 29, p. 138–142, 1981.

GALETTI, JR., P.M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, p. 375–382, 1995.

GAO, S.; ZHANG, T.; ZHOU, X.; ZHAO, Y.; LI, Q.; GUO, Y.; CHENG, H.; ZHOU, R. Molecular cloning, expression of Sox5 and its down-regulation of Dmrt1 transcription in zebrafish. **J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.**, v. 304B, p. 476–483, 2005.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A. Family Anostomidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. (eds). **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p 71-84.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum. Mus. Ciênc. Tecnol.**, v. 13, p. 65-88, 2000.

GEORG, I.; BAGHERI-FAM, S.; KNOWER, K. C.; WIEACKER, P.; SCHERER, G.; HARLEY, V. R. Mutations of the SRY-responsive enhancer of SOX9 are uncommon in XY gonadal dysgenesis. **Sex. Dev.**, v. 4, p. 321-325, 2010.

GILBERT, S. F. **Developmental biology**. 8. ed. Sunderland: Sinauer, 2006. 817 p.

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*). **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 272, p. 662–666, 2000.

GRANDI, G.; COLOMBO, G. Development and early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla anguilla* [L], Anguilliformes, Teleostei): a cytological and ultrastructural study. **J. Morphol.**, v. 231, p. 195–216, 1997.

GRIER, H. J.; HURK, R.; BILLARD, R. Cytological identification of cells types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. **Cell Tissue Res.**, v. 257, p. 491-496, 1989.

HATTORI, R. S.; GOULD, R. J.; FUJIOKA, T.; SAITO, T.; KURITA, J.; STRÜSSMANN, C. A.; YOKOTA, M.; WATANABE, S. Temperature dependent sex determination in Hd-rR medaka *Oryzias latipes*: gender sensitivity, thermal threshold, critical period, and *DMRT1* expression profile. **Sex. Dev.**, v. 1, p. 138–146, 2007.

HEALY, C.; UWANOGHO, D.; SHARPE, P. T. Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. **Dev. Dyn.**, v. 215, p. 69–78, 1999.

HERPIN, A.; SCHINDLER, D.; KRAISS, A.; HORNUNG, U.; WINKLER, C.; SCHARTL, M. Inhibition of primordial germ cell proliferation by the medaka male determining gene Dmrt 1 bY. **BMC Dev. Biol.**, v. 7, p. 99, 2007

HORNUNG, U.; HERPIN, A.; SCHARTL, M. Expression of the male determining gene dmrt1bY and its autosomal coorthologue dmrt1a in medaka. **Sex. Dev.**, v. 1, p. 197-206, 2007.

IMBIRIBA, E. P.; LOURENÇO, JR., J. B.; CARVALHO, L. O. D. M.; GÓES, L. B.; ULIANA, D.; BRITO FILHO, L. Criação de pirarucu. **EMBRAPA-SPI**, 1996. 93 p.

JAKUBICZKA, S.; SCHRÖDER, C.; ULLMANN, R.; VOLLETH, M.; LEDIG S.; GILBERG, E.; KROISEL, P.; WIEACKER, P. Translocation and deletion around SOX9 in a patient with acampomelic campomelic dysplasia and sex reversal. **Sex. Dev.**, v. 4, p. 143–149, 2010.

JEONG, H. B.; PARK, J. G.; PARK, Y. J.; TAKEMURA, A.; HUR, S. P.; LEE, Y. D.; KIM, S. J. Isolation and characterization of DMRT1 and its putative regulatory region in the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis*. **Gene**, v. 438, p. 8–16, 2009.

JØRGENSEN, A.; MORTHORST, J. E.; ANDERSEN, O.; RASMUSSEN L. J.; BJERREGAARD, P. Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 6, p. 25, 2008.

KETTLEWELL, J. R.; RAYMOND, C. S.; ZARKOWER, D. Temperature-dependent expression of turtle *DMRT1* prior to sexual differentiation. **Genesis**, v. 26, p. 174–178, 2000.

KLÜVER, N.; KONDO, M.; HERPIN, A.; MITANI, H.; SCHARTL, M. Divergent expression patterns of Sox9 duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization. **Dev. Genes Evol.**, v. 215, p. 297–305, 2005.

KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; GHAN, 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*). **Dev. Dyn.**, v. 237, p. 297–306, 2008.

KOOPMAN, P.; GUBBAY, J.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BADGE, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. **Nature**, v. 351, p. 117–121, 1991.

LAUDET, V.; STEHELIN, D.; CLEVERS, H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 2493–2501, 1993.

LEI, N.; HECKERT, L. L. Sp1 and Egr1 regulate transcription of the *Dmrt1* gene in Sertoli cells. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 675–684, 2002.

LEI, N.; HECKERT, L. L. Gata4 regulates testis expression of *Dmrt1*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, p. 377–388, 2004.

LIN, F.; DABROWSKI, K.; TIMMERMANS, L. P. M. Early gonadal development and sexual differentiation in muskellunge (*Esox masquinongy*). **Can. J. Zool.**, v. 75, p. 1262–1269, 1997.

LIU, Z.; WU, F.; JIAO, B.; ZHANG, X.; HU, C.; HUANG, B.; ZHOU, L.; HUANG X.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; NAGAHAMA, Y.; CHENG, C. H. K.; 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. **J. Endocrinol.**, v. 194, p. 223–241, 2007.

MARCHAND, O.; GOVOROUN, M.; D'COTTA, H.; MC-MEEL, O.; LAREYRE, J. J.; BERNOT, A.; LAUDET, V.; GUIGUEN, Y. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1493, p. 180–187, 2000.

MARIN, I.; BAKER, B. S. The evolutionary dynamics of sex determination. **Science**, v. 281, p. 1990–1994, 1998.

MATSUDA, M. Sex Determination in the teleost medaka, *Oryzias latipes*. **Annu. Rev. Genet**, v. 39, p. 293–307, 2005.

MATSUDA, M.; NAGAHAMA, Y.; SHINOMIYA, A.; SATO, T.; MATSUDA, C.; KOBAYASHI, T.; MORREY, C. E.; SHIBATA, N.; ASAKAWA, S.; SHIMIZU, N.; HORIK, H.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M. DMY is a Y specific DM domain gene required for male development in the medaka fish. **Nature**, v. 417, p. 559–63, 2002.

MCCURLEY A. T.; CALLARD, G. V. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 102, 2008.

MEIJIDE, F. J.; LO NOSTRO, F. L.; GUERRERO, G. A. Gonadal development and sex differentiation in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A light- and electron-microscopic study. **J. Morphol.**, v. 264, p. 191–210, 2005.

MOLINA, W. F.; SCHMID, M.; GALETTI, JR., P. M. Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios.**, v. 94, p. 141–149, 1998.

MOYLE, P. B.; CECH, J. J. **Fishes: an introduction to ichthyology**. 5. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2004. 744 p.

NAGAHAMA, Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 38, p. 217–229, 1994.

NAKAMOTO, M.; SUZUKI, A.; MATSUDA, M.; NAGAHAMA, Y.; SHIBATA, N. Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 333, p. 729–736, 2005.

NAKAMURA, M.; NAGAHAMA, Y. Steroid producing cells during ovarian differentiation of the tilapia *Sarotherodon niloticus*. **Dev. Growth Differ.**, v. 27, p. 701–708, 1985.

NAKAMURA, M.; NAGAHAMA, Y. Differentiation and development of Leydig cells, and change of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 7, p. 211–219, 1989.

NAKAMURA, M.; SPECKER, J. L.; NAGAHAMA, Y. Ultrastructural analysis of the developing follicle during early vitellogenesis in tilapia, *Oreochromis niloticus*, with special reference to the steroid-producing cells. **Cell Tissue Res.**, v. 272, p. 33–39, 1993.

NAKAMURA, M.; MARIKO, T.; NAGAHAMA, Y. Ultrastructure and in vitro steroidogenesis of the gonads in the protandrous anemonefish *Amphiprion frenatus*. **Jpn. J. Ichthyol.**, v. 41, p. 47–56, 1994.

NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X. T.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **J. Exp. Zool.**, v. 281, p. 362–372, 1998.

NAKAMURA, M.; BHANDARI, R. K.; HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. **Fish. Physiol. Biochem.**, v. 28, p. 113–117, 2003.

NAKAMURA, S., KOBAYASHI, K., NISHIMURA, T., HIGASHIJIMA, S., TANAKA, M. Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. **Science**, v. 328, p. 1561–1563, 2010.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4. ed. New York: John Wiley and Sons, 2006. 601 p.

NOMURA, H. Fecundidade, maturação sexual e índice gônado-somático de lambaris do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 35, n. 4, p. 775–798, 1975.

ORSI, M. L.; SHIBATTA, O. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Caracterização biológica de populações de peixes do Rio Tibaji, localidade de Sertãoópolis. In: MEDRI, M. E., BIANCHINI, E., SHIBATTA, O. A., PIMENTA, J. A. (Eds.). **A bacia do Rio Tibaji**. Londrina, UEL, 2002. p. 425–432.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 116, p. 218–223, 2007.

PATÍÑO, R.; DAVIS K. B.; SCHOORE, J. E.; UGUZ, C.; STRUSSMANN, C. A.; PARKER, N. C.; SIMCO, B. A.; GOUDIE, C. H. A. Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. **J. Exp. Zool.**, v. 276, p. 209–218, 1996.

PAUL-PRASANTH, B.; MATSUDA, M.; LAU, E. L.; SUZUKI, A.; SAKAI, F.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y. Knock-down of DMY initiates female pathway in the genetic male medaka, *Oryzias latipes*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 351, p. 815–819, 2006.

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

RAGHUVeer, K.; SENTHILKUMARAN, B. Isolation of sox9 duplicates in catfish: localization, differential expression pattern during gonadal development and recrudescence, and hCG-induced up-regulation of sox9 in testicular slices. **Reproduction**, v. 140, p. 477–487, 2010.

RAYMOND, C. S.; SHAMU, C. E.; SHEN, M. M.; SEIFERT, K. J.; HIRSCH, B.; HODGKIN, J.; ZARKOWER, D. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. **Nature**, v. 391, p. 691–695, 1998.

RAYMOND, C.S.; KETTLEWELL, J.R.; HIRSCH, B.; BARDWELL, V.J.; ZARKOWER, D. Expression of DMRT1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. **Dev. Biol.**, v. 215, p. 208–220, 1999.

RAYMOND, C. S.; MURPHY, M. W.; O'SULLIVAN, M. G.; BARDWELL, V. J.; ZARKOWER, D. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. **Genes Dev.**, v. 14, p. 2587-2595, 2000.

RAZ, E. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. **Nat. Rev. Genet.**, v. 4, p. 690-700, 2003.

SAITO, D.; MORINAGA, C.; AOKI, Y.; NAKAMURA, S.; MITANI, H.; FURUTANI-SEIKI, M.; KONDOH, H.; TANAKA, M. Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: Insights from germ cell-depleted mutant zenzai. **Dev. Biol.**, p. 310, p. 280–290, 2007.

SANTOS, R. A. Dinâmica da nutrição do tambuí *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Pisces, Characiformes, Characidae) na represa de Ibatinga, SP., Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 22, n. I, p. 115-124, 1995.

SATOH, N.; EGAMI, N. Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 28, p. 385–395, 1972.

SCHARTL, M. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. **Genet. Dev.**, v. 14, p. 634–641, 2004.

SEKIDO, R.; LOVELL-BADGE, R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. **Nature**, v. 453, p. 930–934, 2008.

SELIM, K. M.; SHINOMIYA, A.; OTAKE, H.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M. Effects of high temperature on sex differentiation and germ cell population in medaka, *Oryzias latipes*. **Aquaculture**, v. 289, p. 340–349, 2009.

SHIBATA, K.; TAKASE, M.; NAKAMURA, M. The Dmrt1 expression in sex reversed gonads of amphibians. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 127, p. 232–241, 2002.

SHIBATTA, O. A.; ORSI, M. L.; BENNEMANN, S. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibaji. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A. E.; PIMENTA, J. A (Eds). **A bacia do Rio Tibaji**. Londrina , UEL, 2002. p. 403-423.

SILVA, N. R.; SANTOS, A. L. Q.; FERREIRA, F. A.; PINESE, J. F. Adaptação, aclimação e desenvolvimento do pirarucu (*Arapaima gigas*) em criação intensiva. **Veterinária Notícias**, v.1, n.1, p. 57-61, 1995.

SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; GRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J.; FOSTER, J. W.; FRISCHAUF, A. M.; LOWELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P. N. A gene from the human sex-determination region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, v. 346, p. 240–244, 1990.

STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F.; TODA, K. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture**, v. 139, p. 31–45, 1996.

SWAIN, A.; LOVELL-BADGE, R. Mammalian sex determination: a molecular drama. **Genes Dev**, v. 13, p. 755-767, 1999.

TAYLOR, C. A.; BURR, B. M. Reproductive biology of the northern starhead topminnow, *Fundulus dispar* (Osteichthyes: Fundulidae), with a review of data for freshwater members of the genus. **Am. Midl. Nat.**, v. 137, p. 151–164, 1997.

TEMEL, S. G.; GULTEN T.; YAKUT T.; SAGLAM H.; KILIC N.; BAUSCH E.; JIN W. J.; LEIPOLDT M.; SCHERER G. Extended pedigree with multiple cases of XX sex reversal in the absence of *SRY* and of a mutation at the *SOX9* locus. **Sex. Dev.**, v. 1, p. 24–34, 2007.

TERANISHI, M.; SHIMADA, Y.; HORI, T.; NAKABAYASHI, O.; KIKUCHI, T.; MACLEOD, T.; PYM, R.; SHELDON, B.; SOLOVEI, I.; MACGREGOR, H.; MIZUNO, S. Transcripts of the MHM regions on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells and adjacent to the *DMRT1* locus. **Chromosome Res.**, v. 9, p. 147–165, 2001.

VIDAL, V. P. I.; CHABOISSIER, M. C.; DE ROOIJ, D. G.; SCHEDL, A. *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. **Nat. Genet.**, v. 28, p. 216–217, 2001.

VILIA, P.; CANARIO, A. V. M. Effect of LHRH on sex reversal and steroid levels on gilthead seabream (*Sparus aurata*). Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Univ. Austin, TX (USA). **Fish Symposium** 95, Austin, TX, USA, p. 329, 1995.

VIZZIANO-CANTONNET, D.; BARON, D.; MAHÈ, S.; CAUTY, C.; FOSTIER, A.; UIGUEN, Y. Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 41, p. 277–288, 2008.

VIZZIANO, D.; RANDUINEAU, G.; BARON, D.; CAUTY, C.; GUIGUEN, Y. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Dev. Dyn.**, v. 236, p. 2198–2206, 2007.

VIZZIANO, D.; BARON, D.; RANDUINEAU, G.; MAHÉ, S.; CAUTY, C.; GUIGUEN, Y. Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. **Biol. Reprod.**, v. 78, p. 939–946, 2008.

VOLFF, J. N.; NANDA, I.; SCHMID, M.; SCHARTL, M. Governing sex determination in fish: Regulatory putsches and ephemeral dictators. **Sex. Dev.**, v. 1, p. 85–99, 2007.

WANG, D. S.; ZHOU, L. Y.; KOBAYASHI, T.; MATSUDA, M.; SHIBATA, Y.; SAKAI, F.; NAGAHAMA, Y. *Doublesex*- and *mab-3*-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 1331–1340, 2010.

WEIDINGER, G.; WOLKE, U.; KÖPRUNNER, M.; KLINGER, M.; RAZ, E. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. **Development**, v. 126, p. 5295–5307, 1999.

WILHELM, D.; PALMER, S.; KOOPMAN, P. Sex determination and gonadal development in mammals. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 1–28, 2007.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: **Fish Physiology**, Vol. III. HOAR, W. S.; RANDALL, D. J., eds. New York: Academic Press, 1969. p. 117–175.

YOSHIMOTO, S.; OKADA, E.; UMEMOTO, H.; TAMURA, K.; UNO, Y.; NISHIKIDA-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*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 2469–2474, 2008.

YOSHIMOTO, S.; IKEDA, N.; IZUTSU, Y.; SHIBA, T.; TAKAMATSU, N.; ITO, M. Opposite roles of *DMRT1* and its W-linked paralogue, *DM-W*, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. **Development**, v. 137, p. 2519–2526, 2010.

YOON, C.; KAWAKAMI, K.; HOPKINS, N. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. **Development**, v. 124, p. 3157–3165, 1997.

ZHOU, L.; GUI, J-F. Molecular mechanisms underlying sex change in hermaphroditic groupers **Fish Physiol. Biochem.**, v. 36, p. 181–193, 2010.

ZHOU, R.; LIU, L.; GUO, Y.; YU, H.; CHENG, H.; HUANG, X.; TIERSCH, T. R.; BERTA, P. Similar gene structure of two Sox9a genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). **Mol. Reprod. Dev.**, v. 66, p. 211–217, 2003.