

Carolina Pereira Gomes

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

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

São Paulo

2013

Resumo

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

Abstract

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

Introdução Geral

1.1 Biologia Reprodutiva de teleósteos

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

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

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

A fase embrionária compreende o período no qual o desenvolvimento possui dependência nutricional da mãe. Durante a fase larval, que distingue os peixes ósseos

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

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

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

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

- Protândricos, aqueles em que as gônadas funcionam primeiramente como masculinas;

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

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

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

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

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

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

As espécies não guardiãs são aquelas que não protegem seus ovos e jovens, desovando em substrato aberto. Já as espécies guardiãs, cuidam dos ovos e dos embriões até que ocorra a eclosão ou, em alguns casos, até a fase larval apresentando comportamento de corte elaborado e também comportamento territorialista. As espécies consideradas portadoras são aquelas que carregam embriões ou em alguns casos, os jovens, externa ou internamente ao corpo. Nos teleósteos a grande maioria das espécies são não guardiãs, seguindo-se de guardiãs e portadoras (Vazzoler, 1996; Moyle & Cech, 2004).

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

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

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

Os estudos que abordam os aspectos reprodutivos dos peixes permitem compreender o ciclo reprodutivo e de vida das espécies, como as gônadas se desenvolvem e ainda como a proporção sexual apresenta-se nas populações, bem como, permitem analisar a estratégia adotada pelas espécies para alcançar o sucesso reprodutivo (Sadovy & Shapiro, 1987). Além disso, os peixes representam modelos de estudos de reprodução para vertebrados superiores (Bone & Moore, 2008).

1.2 Hormônios envolvidos na reprodução de peixes teleósteos

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

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

Essa gama complexa de eventos que formam a cascata reprodutiva é controlada por inúmeros fatores endócrinos ao longo do eixo principal relacionado à reprodução, o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Este se comunica com o ambiente por meio de órgãos do sentido, que estimulam o hipotálamo, este por sua vez, transmite sinais para a hipófise, ou também conhecida como glândula pituitária, por meio de fibras nervosas

transportando hormônios GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) (Evans & Claiborne, 2005; da Costa *et al.*, 2012).

O hormônio GnRH é responsável por estimular a hipófise a produzir os hormônios gonadotrópicos, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante); as gonadotrofinas pituitárias têm papel central na regulação da gametogênese e na liberação de hormônios gonadotróficos, os esteroides sexuais, que são produzidos nas gônadas e também no encéfalo em peixes teleósteos (Swanson *et al.*, 2003)

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

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

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

nem sempre é detectada antes da diferenciação da gônada bipotencial em testículos (Nakamura *et al.*, 2003).

Sendo a reprodução um processo fisiológico e endócrino complexo, são muitas as enzimas que participam direta e indiretamente nesta via. A enzima aromatase (P450 aromatase) é responsável por gerar 17 β -estradiol a partir da aromatização de moléculas de testosterona. Os efeitos complexos do estrógeno na diferenciação sexual de peixes são mediados amplamente por meio de mudanças na atividade e expressão da enzima aromatase (P450) (Liu *et al.*, 2007; Norris & Lopez, 2011).

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

1.3A determinação e diferenciação genéticas do sexo em teleósteos

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

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

Cabe ressaltar que, apesar de serem processos relacionados, a determinação e a diferenciação do sexo são eventos que apresentam diferenças em suas definições básicas. A determinação sexual em teleósteos é um evento que pode durar minutos ou até mesmo segundos, já a diferenciação que a segue é um processo mais longo, sendo

ambas ações intimamente relacionadas no decorrer do ciclo de vida dos peixes (Pandian, 2012).

A determinação sexual é o momento onde há probabilidade de encontro entre espermatozoides e ovócitos; este evento determina o sexo da progênie decorrente da fertilização dos ovócitos. Nas espécies com cromossomos sexuais heteromórficos, como aves e mamíferos e maioria dos peixes teleósteos, o sexo é determinado na fecundação pela herança diferencial de cromossomos sexuais. Subsequentemente, o processo de diferenciação sexual, através do qual a progênie é “sexualizada”, ou seja, adquire características sexuais secundárias e/ou comportamentos sexuais diferenciados, é iniciada e pode durar quase toda a vida reprodutiva (Pandian, 2012; Cutting *et al.*, 2013).

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

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

Em contraste, os teleósteos apresentam diversas exceções a este mecanismo, podendo ser o desenvolvimento gonadal influenciado por flutuações de fatores intrínsecos como os hormônios, o crescimento ou o próprio comportamento, ou por fatores extrínsecos como os ambientais (luz e temperatura) e ainda à exposição a

compostos xenobióticos – como hormônios provenientes da pecuária ou esgoto – ou até mesmo a poluição, um mau presente em grande parte dos ambientes aquáticos onde há a influência antrópica (Patiño *et al.*, 1996; Devlin & Nagahama, 2002; Senior *et al.*, 2012).

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

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

1.4 Controle genético da determinação e diferenciação sexual em peixes teleósteos

1.4.1 Sistemas cromossômicos

O dimorfismo sexual pode ser detectado por características morfológicas e/ou por características genéticas como, por exemplo, a presença de cromossomos sexuais diferenciados. Diversos sistemas de determinação sexual evoluíram de forma independente

nos reinos animal e vegetal. Os mais conservados entre estes sistemas consiste naqueles em que o macho é heterogamético e a fêmea homogamética (XY/XX), e o sistema em que a fêmea é heterogamética e o macho homogamético (ZW/ZZ), sendo este último o sistema mais comum entre teleósteos neotropicais (Cioffi *et al.*, 2012; Kamiya *et al.*, 2012).

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

Essa grande variedade de sistemas de determinação sexual é observada principalmente em animais da região Neotropical. Segundo estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2007) cerca de 1.040 espécies dessa região já foram estudadas citogeneticamente, sendo que, em 62 dessas espécies, foram observados cromossomos sexuais diferenciados. Dentre estas, a maioria (40 espécies) apresentou heterogamia feminina (ZZ/ZW) (Devlin & Nagahama, 2002; Maistro *et al.*, 1998).

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

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

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

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

A plasticidade dos sistemas cromossômicos tem relação também com componentes genômicos como os elementos transponíveis e DNA satélites, que contribuem para a variação dentro e entre as espécies. Estudos sugerem que tais elementos podem também ter importante papel no nível cromossômico e nuclear, já que os mesmo são capazes de mudar a composição molecular de cromossomos sexuais e reduzir a taxa de recombinação entre eles (Kejnousky, 2009).

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

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

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

Dentre os diversos genes relacionados ao desenvolvimento sexual, um dos mais conservados na determinação do sexo em vertebrados é o fator de transcrição *DMRT1* (*doublesex/mab-3 related transcription fator-1*) responsável pela transcrição de proteínas com o domínio DM, com estrutura e função conservadas. O gene *DMRT1* foi descrito pela primeira vez nos reguladores sexuais de invertebrados, *doublesex* de *Drosophila* e MAB-3 de *Caenorhabditis elegans* e estão relacionadas ao desenvolvimento sexual de machos em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (Guan *et al.*, 2000; Devlin & Nagahama, 2002; Matsuda *et al.*, 2002; Liu, 2004; Tevosian, 2013).

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

sendo ambos, fatores de transcrição (Wetering *et al.*, 1993; Graves, 1995; Guan *et al.*, 2000; Bratus & Slota, 2006).

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

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

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

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

ductos Müllerianos em embriões de machos, estruturas que persistem durante a diferenciação sexual das fêmeas.

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

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

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

Já Myosho e colaboradores (2012), identificaram outro gene, o *gsdfY* como um forte candidato a gene mestre de diferenciação gonadal nas espécies pertencentes ao mesmo gênero de *Oryzias latipes*: *Orizias luzonensis* e *Orizias curvinotus*. Este gene foi

identificado no cromossomo Y e é responsável por codificar uma proteína secretora pertencente também à família TGF- β , à mesma a qual pertence o hormônio anti-Müllerianos (AMH). Neste mesmo estudo demonstraram que a presença de um alelo localizado no cromossomo Y foi suficiente para reverter o sexo de fêmeas para machos em 94% das fêmeas genéticas (aquelas que apresentam os cromossomos XX).

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

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

Outro importante gene para a diferenciação do sexo é o *cyp19a1a*, que codifica para a aromatase gonadal (P450 aromatase). Esta enzima é expressa nas células granulosas e possui um papel fundamental na diferenciação e desenvolvimento dos ovários em vertebrados, através da conversão de testosterona em estradiol.

A expressão do gene para aromatase gonadal (*cyp19a1a*) foi identificada em algumas das espécies de peixes citadas acima, (*Oreochromis niloticus*, *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio*, *Odontesthes hatcheri* e também em *Perca flavescens*) (D’Cotta *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2008; Gohin *et al.*, 2011; Wang & Orban, 2007; Fernandino *et al.*, 2008 a e b; Uno, 2012), onde a expressão também se

apresentou maior em fêmeas durante a diferenciação sexual em comparação com machos, confirmando a importância do gene no desenvolvimento sexual de fêmeas. Em *Danio rerio* também foi possível observar, por meio de PCR em tempo real, relação entre as expressões dos genes *cyp19a1a* e *amh*, em que o nível de expressão do gene *amh* decaía em relação ao nível de expressão de *cyp19a1a*, confirmando efeitos contrários destes dois genes durante o desenvolvimento sexual em peixes teleósteos (Wang & Orban, 2007).

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

1.50 gênero alvo: *Characidium*

Os Brasil assim como os demais países da América do Sul e da América Central formam o que conhecemos como região biogeográfica Neotropical, considerada a mais rica em espécies de peixes de água doce, compreendendo por volta de 4035 espécies de peixes em um total de aproximadamente 705 gêneros conhecidos e descritos (Lévêque *et al.*, 2008).

Entre os teleósteos, a ordem Characiformes, que é constituída de cerca de 270 gêneros e pelo menos 1674 espécies, grande parte delas está distribuída na região Neotropical, entre o sul dos Estados Unidos e sul da América do Sul (Nelson, 2006). Entre os gêneros com ampla distribuição na ordem Characiformes, o *Characidium* é o

mais rico em número de espécies dentro da subfamília Characidiinae (Chrenuchidae), constituída por um total de nove gêneros, com cerca de 50 espécies já descritas, ocorrendo desde o Panamá até a Argentina (Buckup, 2003).

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

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

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

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

Segundo Alves (2010), levando em consideração os eventos cromossômicos envolvendo a heterocromatina constitutiva que levam às variações fenotípicas

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

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

Discussão geral e conclusões

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

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

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

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

sequências exclusivas do cromossomo W, que seriam usadas como marcador molecular sexual.

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

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

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

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

O primeiro capítulo consiste na investigação da ocorrência de genes envolvidos na diferenciação sexual já descrito para outras espécies de teleósteos, em *Characidium*

schubarti; como visto neste capítulo, foi possível a identificação de dois dos genes alvos do estudo: *dmrt1* e *cyp19a1a*.

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

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

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

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

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

Mesmo tendo sido aplicados hormônios para a aceleração e compensação, o papel do ambiente não pode ser descartado, como a presença de correnteza e até mesmo um substrato adequado para a desova. A ausência de elementos ambientais foi,

possivelmente, a causa da não reprodução em cativeiro dos exemplares de *Characidium schubarti*.

Mesmo com as dificuldades encontradas no decorrer do projeto, esta dissertação apresenta grande contribuição nos estudos de biologia reprodutiva da espécie. Principalmente, por ser um passo importante no início dos estudos genéticos da diferenciação sexual em espécies de peixes Neotropicais. Além disso, oferece uma importante possibilidade de pesquisa que envolve os mecanismos moleculares envolvidos na reprodução de peixes no laboratório de Ictiogenética do Instituto de Biociências, além da criação de peixes para fins reprodutivos, prática nova no grupo de pesquisa.

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

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

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

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

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

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

Referências Bibliográficas

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

- BUCKUP, PA. The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 108: p. 225-245, fev-out. 1993.
- BUCKUP, PA. Family Crenuchidae (South American Darters). In: Reis R, Kullander ESO, Ferraris Jr CJ editors. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre. *Edipucrs*. p. 87-95. 2003.
- CALLARD, GV; TCHOUDAKOVA, AV; KISHIDA, M; WOOD, E. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish J. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 79: p 305-314. 2001.
- CAPEL, B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu. Rev. Physiol.* 60: p. 497- 523, 1998.
- CASATTI, L; CASTRO, R. Testing the ecomorphological hypothesis in a headwater riffles fish assemblage of the Rio São Francisco, southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*.4(2): p. 203-214. 2006.
- CENTOFANE, L; BERTOLLO, LAC; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*.54: p. 253-260. 2001.
- CENTOFANE, L; BERTOLLO, LAC; BUCKUP, PA; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Chrenuchidae, Characidiinae). *Hereditas*.138: p. 213-218. 2003.
- CHARLESWORTH, D; CHARLESWORTH, B; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Hereditas*. 95: p.118-128. 2005
- CHEN, SX; BOGERD, J; SCHOONEN, NE; MARTIJN, J; DE WAAL, PP; SCHULZ, RW. A progestin (17alpha,20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 185: p.1-9. 2013.a
- CHEN, J; HU, W; ZHU, Z. Progress in studies of fish reproductive development regulation. *Chinese Science Bulletin*. 58(1), p. 7-16. 2013. b
- CIOFFI, MB; KEJNOVSKY, E; BERTOLLO, LAC. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplismalabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and genome research*. 132(4): p. 289-296, 2010
- CIOFFI, MB, MOREIRA-FILHO, O, ALMEIDA-TOLEDO, LF; BERTOLLO, LAC. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *Journal of Fish Biology*.80(6): p. 2125-2139, 2012.
- CONSTEN, D; BOGERD, J; KOMEN, J; LAMBERT, JGD; GOOS, HJT. Long-term cortisol treatment inhibits pubertal development in male common carp, *Cyprinus carpio* L. *Biol. Reprod.* 64: p. 1063-1071. 2001.

- CUTTING, A; CHUE, J; SMITH, CA. Just how conserved is vertebrate sex determination? *Developmental Dynamics*. 242: p. 380–387. 2013.
- DA COSTA, RB, OS, R; M, R; F, JO. Possibilidades da exploração comercial de peixes reofílicos em cativeiro: Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 6(2), p. 52-73. 2012.
- D’COTTA, H; FOSTIER, A; GUIGEN, Y; GOVOROUN, M, BAROILLER, JF. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of *Tilapia Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*. 59: p. 265-276. 2001.
- DE GRANDI, A; CALVARI, V; BERTINI, V; BULFONE, A; PEVERALI, G; CAMERINO, G; GUIOLI, S. The expression pattern of a mouse *doublesex related* gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mechanisms of development*. 90(2): p. 323-326. 2000.
- DELOFFRE, LA; MARTINS, RS; MYLONAS, CC; CANARIO, AV. Alternative transcripts of *DMRT1* in the European sea bass: Expression during gonadal differentiation. *Aquaculture*. 293(1): p. 89-99. 2009.
- DEVLIN, RH; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 208: p. 191-364. 2002.
- DUMONT-NETO, R; PELLI, A; FREITAS, JL; COSTA, CL; FREITAS, AE; BARBOSA, NDC. Reprodução induzida da Piracanjuba (*Bryconorbignyanus Valenciennes, 1903*) durante a primeira maturação sexual, cultivada em cativeiro na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental de Volta Grande – CEMIG. *B. Instituto de pesca*. 24: p. 105-107. 1997.
- EVANS, DH; CLAIBORNE, JB. The physiology of Fishes; Third edition. *CRC press*. 2005.
- FERNANDINO, JL; GUILGUR, LG; STROBL-MAZZULLA, PH; SOMOZA, GM. Molecular cloning of SOX9, DMRT1 and SF1 cDNA partial sequences in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: p. 145-146. 2003
- FERNANDINO, JI, GUILGUR LG, SOMOZA GM. Dmrt1 expression analysis during spermatogenesis in Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol Biochem*. 32: p. 231- 240. 2006.
- FERNANDINO, JI; HATTORI, RS; SHINODA, T; KIMURA, H; STROBL-MAZZULLA, PH; STRÜSSMANN, CA; SAMOZA, GM. Dimorphic Expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (Ovarian Aromatase) during Early Gonadal Development in Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sexual Development*. 2: p. 316- 324. 2008a.
- FERNANDINO, JI; RS, HATTORI, KIMURA, H; STRUSSMANN, CA; SOMOZA, GM. Expression Profile and Estrogenic Regulation of Anti-Mullerian Hormone During Gonadal Development in Pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a Teleost Fish With Strong Temperature-Dependent Sex Determination. *Developmental Dynamics*. 237: p. 3192-3199. 2008b.

- GITTLEMAN, JL The phylogeny of parental care in fishes. *Animal Behaviour*. 29: p. 936-941. 1981.
- GOHIN, M; BODINIER, P; FOSTIER, A; CHESNEL, F; BOBE, J. Aromatase is expressed and active in the Rainbow Trout oocyte during final oocyte maturation. *Molecular Reproduction & Development*.78: p. 510-518. 2011.
- GRAVES, JAM. The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes.*Philosophical Transactions: Biological Sciences*. 350(1333): p. 305-312. 1995.
- GUAN, G; KOBAYASHI, T; NAGAHAMA, Y; Sexually Dimorphic Expression of Two Types of DM (*Doublesex/Mab-3*)-Domain Genes in a Teleost Fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*).*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272: p. 662- 666. 2000.
- GUIGUEN Y; BAROILLER JF; RICORDEL MJ; ISEKI K; MCMEEL OM; MARTIN SAM; FOSTIER A. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol Reprod Dev*. 54: p. 154–162. 1999.
- GUO, Y; CHENG, H; HUANG, X; GAO, S; YU, H; ZHOU, R. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish Dmrt1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.330: p. 950-957. 2005.
- HALL, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl.Acids.Symp. Ser.* (41): p.95-98.
- HALM, S; ROCHA, A; MIURA, T; PRAT, F; ZANUY, S. Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: Its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms.*Gene*. 388(1): p.148-158. 2007.
- HATTORI, RS; MURAI, Y; OURA, M; MASUDA, S; MAJHI, SK; SAKAMOTO, T; FERNANDINO, JI; SOMOZA, GM; YOKOTA, M; STRÜSSMANN, CA. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *PNAS*. 109(8): p. 2955-2959.2012.
- HENNING, F. Evolução de cromossomos sexuais no gênero *Eingmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). Dissertação (mestrado) Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. São Paulo, SP. 61 páginas. 2007.
- HERRERO, JD, GARCÍA, MI, CAÑEVERAS, RMP, MOLINA, RMM. Influencia del sistema visual en la reproducción de los peces. p. 191-217.2000
- HUANG,X; GUO, Y; SHUI, Y; GAO, S; YU, H; CHENG, H; ZHOU, R . Multiple alternative splicing and differential expression of dmrt1 during gonad transformation of the rice field eel. *Biology of reproduction*.73(5): p. 1017-1024, 2005.
- ITO, LS, TAKAHASHI, C, YAMASHITA, M, STRUSSMANN, CA. Warm Water Induces Apoptosis, Gonadal Degeneration, and Germ Cell Loss in

Subadult Pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes). *Physiological and Biochemical Zoology*. 81(6): p. 762-774. 2008.

IZQUIERDO, MS, FERNANDÉZ-PALACIOS, H, TACON, AGJ. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*. 197: p. 25-42. 2001.

IWAMA, GK; PICKERING, AD; SUMPTER, JP. Fish stress and health in aquaculture vol. 62. *Cambridge University Press*. 2011.

JONES, DT; TAYLOR, WR; THORNTON, JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comp. Appl. Biosci.* 8: p. 275-282. 1992.

KAMIYA, T; KAI, W; TASUMI, S; OKA, A; MATSUNAGA, T; MIZUNO, N; FUJITA, M; SUETAKE, H; SUZUKI, S; HOSOYA, S; TOHARI, S; BRENNER, S; MIYADAI; VENKATESH, B; SUZUKI, Y; KIKUCHI, K. A Trans-Species Missense SNP in *Amhr2* Is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics*. 8: p. 1-10. 2012.

KARUBE M, FERNANDINO JI, STROBL-MAZZULLA PH, STRÜSSMANN CA, YOSHIZAKI G. Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome P-450 aromatase (*cyp19A1*) gene during the thermolabile sex determination period in Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *J Exp Zool*. 307: p. 625-636. 2007.

KEJNOVSKY E; HOBZA R; CERMÁK T; KUBÁT Z; VYSKOT B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*. 102: p. 533-541. 2009.

KIKUCHI, K; HAMAGUCHI, S. Novel Sex-determination genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics*. p. 1-15. 2013.

KLUVER, N; PFENNIG, F; PALA, I; STORCH, K; SCHLIEDER, M; FROSCHAUER, GUTZEIT, HO; SCHARTL, M. Differential Expression of Anti-Müllerian Hormone (*amh*) and Anti-Müllerian Hormone Receptor Type II (*amhrII*) in the Teleost Medaka. *Developmental Dynamics*. 236: p. 271-281. 2007.

KOBAYASHI, T; KAJIURA-KOBAYASHI, H; GUAN, G.; NAGAHAMA, Y. Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental Dynamics*. 237(1): p. 297-306. 2008.

KOLM, N. Parental care. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of fishes (Agnathans and Body Fishes)*. Science Publishers. 8: p. 351-371. 2009.

LARSON, ET. Neuroendocrine Regulation in Sex-changing Fishes. In: *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 1-Fishes*. Elsevier. p. 149-164. 2011.

LÉVÊQUE, C., OBERDORFF, T., PAUGY, D., STIASSNY, MLJ., TEDESCO, PA., Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*. 595: p. 545-567. 2008.

LI, M; WANG, L; WANG, H; LIANG, H; ZHENG, Y; QIN, F; WANG, Z. Molecular cloning and characterization of *amh*, *dax1* and *cyp19a1a* genes and their response to

17 α -methyltestosterone in pengze crucian carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2013.

LIMA, LC, RIBEIRO, LP, LEITE, RC, MELO, DC. Estresse em peixes. Ver Brasileira de Reprodução Animal, 30(¾): p. 113-117. 2006.

LIU, Z; MOORE, PH; MA, H; ACKERMAN, CM; RAGIBA, M; YU, O; PEARL, HM; KIM, MS; CHARLTON, JW; STILES, JI; ZEE, FT; PATERSON, AH; MING, R. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Letters to Nature*.427(22). 2004.

LIU, Z; WU, F; JIAO, B; ZHANG, X; HU, C; HUANG, B; WANG, D. Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *Journal of endocrinology*. 194: p 223-241. 2007.

MAISTRO, E; MATA, E; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum*(Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica*.104: p. 1-7. 1998.

MARCHAND, O; GOVOROUN, M; D’COTTA, H; McMEEL, O; LAREYRE, JJ; BERNOT, A; LAUDET, V; GUIGUEN, Y. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *BiochimicaetBiophysicaActa*.1493: p. 180-187. 2000.

MATSUDA, M; NAGAHAMA, Y; SHINOMIYA; SATO, T; MATSUDA, C; KOBAYASHI, T; MORREY, C; SHIBATA, N; ASAKAWA, S; SHIMIZU, N; HORI, H, HAMAGUCHI, S; SAKAIZUMI, M. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the Medaka fish. *Nature*.417: p. 559-562. 2002.

MELO, MRS. Sistemática, filogenia e Biogeografia do Grupo *Characidium lauroi* Travassos, 1949 (Characiformes, Crenuchidae). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 95p. 2001.

MILLA, S., WANG, N., MANDIKI, S. N. M., & KESTEMONT, P. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction?. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 153(3): p. 242-251. 2009.

MIURA, T; MIURA, C; KONDA, Y; YAMAUCHI, K. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development*. 129: p. 2689–2697. 2002.

MYLONAS, CC; FOSTIER, A; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*.165: p. 516-534. 2009.

MYOSHO, T; OTAKE, H; MASUYAMA, H; MATSUDA, M; KUROKI, Y; FUJIYAMA, A; NARUSE, K; HAMAGUCHI, S; SAKAIZUMI, M. Tracing the Emergence of a Novel Sex-Determining Gene in Medaka, *Oryziasluzonensis*. *Genetics Society of America*.191: p. 163-170. 2012.

]

- MOYLE, P.B. & J.J. CECH. Fishes: An Introduction to Ichthyology. Londres, Prentice-Hall Inc., 4 ed, 2004.
- NAKAMURA, M.; BHANDARI, RK; HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. p. 113-117. 2003.
- NANDA, I; KONDO, M; HORNUNG, U; ASAKAWA, S; WINKLER, C; SHIMIZU, A; SHAN, Z; HAAF, T; SHIMIZU, N; SHIMA, A; SCHMID, M; SCHARTL, M.A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the Medaka *Oryzias latipes*. *Genetics (PNAS)*. 99(18): p. 11778-11783. 2002.
- NAVARRO, RD, FILHO, OPR, FERREIRA, WM, PEREIRA, FKS. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. *Brasileira de Reprodução humana*. 33(1): p. 20-25. 2009.
- NELSON, JS. Fishes of the World. 4 ed. *Wiley.com*. 2006.
- NIKOLSKII, G.V. Theory of fish population dynamics as the biological background for rational exploitation and management of fishery resources. *Edinburgh: Oliver & Boyd*. p. 320. 1969.
- NOLETO, RB; AMORIN, AP; VICARI, MR; ARTONI, RF; CESTARI, MM. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of Fish Biology*. 75: p. 448-453. 2009.
- OHNO, S. Sex chromosomes and sex-linked genes. *Springer*, Berlin, 1967.
- OLIVA-TELES, A. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases*. 35 (2): p. 83-108. 2012.
- OLIVEIRA C, FORESTI F, ALMEIDA-TOLEDO LF. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: *Fish Cytogenetics*. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. eds. Enfield, *Science Publisher*. p.111-164. 2007.
- OLIVEIRA, RF; GALHARDO, L. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleosteos e implicações para a piscicultura. *Rev. Bras. Zootecn*. 36: p. 77-86. 2007.
- OHTSUKA, M; MAKINO, S; YODA, K; WADA, H; NARUSE, K; MITANI, H; INOKO, H. Construction of a linkage map of the medaka (*Oryzias latipes*) and mapping of the Da mutant locus defective in dorsoventral patterning. *Genome research*. 9(12): p. 1277-1287. 1999.
- OZOUF-COSTAZ, C; BRANDT, J; KORTING, C; PISANO, E; BONILLO, C; COUTANCEAU, JP; VOLFF, JN. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Sci*. 16: p.51-57. 2004.
- PALA, I; KLUVER, N; THORSTEINSDÓTTIR, S; SCHARTL, M; COELHO, MM. Expression pattern of anti-Müllerian hormone (amh) in the hybrid fish complex of *Squalius alburnoides*. *GENE* 410: p. 249-258. 2008.

- PANDIAN, T. J. Genetic Sex Differentiation in Fish. *CRC Press*. 2012.
- PARK, JW; TOMPSETT, A; ZHANG, X; NEWSTED, JL; JONES, PD; AU, D; KONG, R; WU, RSS; GIESY, JP; HECKER, M. Fluorescence in situ hybridization techniques (FISH) to detect changes in CYP19a gene expression of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 232: p. 226-235. 2008.
- PATIÑO, R; DAVIS, KB; SCHOORE, JE; UGUZ, C; STRUSSMANN, CA; PARKER, NC; SIMCO, BA; GOUDIE, CHA. Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *J. Exp. Zool.* 276: p. 209-218. 1996.
- PEREIRA, LHG, MAIA, GMG, HANNER, R, FORESTI, F, OLIVEIRA, C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*.21: p. 1-9, 2010.
- POONLAPHDECHA, S; PEPEY, E; CANONNE, M; DE VERDAL, H; BAROILLER, JF; D’COTTA, H. Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *General and comparative endocrinology*. 193: p. 234-242. 2013.
- POURSAEID, S; FALAHATKAR, B; MOJAZI AMIRI, B; VAN DER KRAAK, G. Effects of long-term cortisol treatments on gonadal development, sex steroids levels and ovarian cortisol content in cultured great sturgeon *Husohuso*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 163(1): p. 111-119. 2012.
- RAHN, JJ; STACKLEY, KD; CHAN, SS. Opa1 Is Required for Proper Mitochondrial Metabolism in Early Development. *PLoS one*. 8(3): e59218. 2013.
- RAYMOND, CS; SHAMU, CE; SHEN, MM; SEIFERT, KJ; HIRSCH, B; HODGKIN, J; ZARKOWER, D. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*. 391(6668): p. 691-695. 1998.
- RIBEIRO, CS; MOREIRA, RG. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. *Revista da Biologia*. 08: p.58-61. 2012.
- RODRÍGUEZ-MARI, A; YAN, Y; BREMILLER, RA; WILSON, C; CAÑESTRO, C; POSTLETHWAIT, JH. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expression Patterns*.5: p. 655–667. 2005.
- ROUILLER-FABRE, V. CARMONA,S; MERHI, AS; CATE, R; HABERT, R; VIGIER B. Effect of anti Mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats *Endocrinology*. 139 (1998): p. 1213–1220. 1998.
- ROZEN, S; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* Humana Press. p.365-386. 1999.
- SADOVY, Y.; SHAPIRO, DY. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*, p. 136-156. 1987.

- SANDRA, GE; NORMA, MM. Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*.20(1): p. 101-121. 2010.
- SATO,T; YOKOMIZO, S; MATSUDA, M; HAMAGUCHI, S; SAKAIZUMI, M. Gene-centromere mapping of medaka sex chromosomes using triploid hybrids between *Oryzias latipes* and *O. luzonensis*. *Genetica*.111: p.71-75. 2001.
- SCHWEDLER, TE. Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture. *Animal Welfare Information Center Bulletin*. 1999
- SENIOR, AM; LIM, JN; NAKAGAWA, S. The fitness consequences of environmental sex reversal in fish: a quantitative review. *Biological Reviews*. 87(4): p. 900-911. 2012.
- SHAO, C; LIU, G; LIU, S; LIU, C; CHEN, S. Characterization of the cyp19a1a gene from a BAC sequence in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and analysis of its conservation among teleosts. *Acta Oceanologica Sinica*. 32(8): p. 35-43.2013.
- SINCLAIR, AH; BERTA, P; PALMER, MS; HAWKINS, JR; GRIFFITHS, BL; SMITH, MJ; FOSTER, JW; FRISCHAUF, AM; LOVELL-BADGE, R; GOODFELLOW, P. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*.346: 240-244. 1990.
- SMITH, EK; GUZMÁN, JM; LUCKENBACH, JA. Molecular cloning, characterization, and sexually dimorphic expression of five major sex differentiation-related genes in a Scorpaeniform fish, sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2013
- SMITH, CA; ROESZLER, KN; OHNESORG, T; CUMMINS, DM; FARLIE, PG; DORAN, TJ; SINCLAIR, HA. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*.416: p. 267-271. 2009.
- SWANSON, P; DICKEY, JT; CAMPBELL, B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and biochemistry*. 28: p. 53-59. 2003.
- TAKEHANA, Y; Naruse, K; Hamaguchi, S; Sakaizumi, M. Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias latipes* and *O. dancena*. *Chromosoma*, 116(5): p. 463-470. 2007.
- TAMURA, K; PETERSON, D; PETERSON, N; STECHER, G; NEI, M; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.*Molecular biology and evolution*.28(10): p. 2731-2739. 2011.
- TARANGER, GL; CARRILO, M; SCHULZ, RW; FONTAINE, P; ZANUY, S; FELIP, A; WELTZIEN, F; DUFOUR, S; KARLSEN, O; NORBERG, B; ANDERSSON, E; HANSEN, T. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*.165: p. 483-515. 2009.
- TEVOSIAN, S. DMRT1 Owner's Manual: Synchronized Installation Required to Operate. *Biology of reproduction*. 88(2): p. 50, 2013.

- TRANT, JM. Isolation and Characterization of the cDNA Encoding the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Form of Cytochrome P450arom. *General and comparative endocrinology*. 95(2): p. 155-168. 1994.
- UNO, T; MAYUMI, I; TAKAO, I. Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 34(1):p. 1-13.2012.
- VAZZOLER, AEADEM. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. *EDUEM: Maring*. 1996.
- VICARI, MR; ARTONI, RF; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, LAC. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in Characidium fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica*. 134(3): p. 311–317. 2008.
- VIZZIANO-CANTONNET, D; BARON, D; MAHÈ, S; CAUTY, C.; FOSTIER, A; GUIGUEN, Y. Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*. 41(5): p. 277-288. 2008.
- VOLFF, JN; NANDA, I; SCHMID, M; SCHARTL, M. Governind Sex Determination in Fish: Regulatory Putsches and Ephemeral Dictators. *Sexual Development*. 1(2): p. 85-99. 2007.
- Von IHERING, R.; AZEVEDO, P. A curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). *Archivos do Instituto Biológico*. 5: p.143-184. 1934.
- WANG, XG; ORBAN, L. Anti-Müllerian Hormone and 11-Hydroxylase Show Reciprocal Expression to That of Aromatase in the Transforming Gonad of Zebrafish Males. *Developmental Dynamics*. 236: p. 1329-1338. 2007.
- WANG, X; ZHANG, Q; REN, J; JIANG, Z; WANG, C; ZHUANG, W; ZHAI, T. The preparation of sex-chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture*. 297: p. 78-84. 2009.
- WETERING, MV; OOSTERWEGEL, M; NORREN, KV; CLEVERS, H. Sox-4, an SRY-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *The EMBO journal*. 12(10): p. 3847- 3854. 1993.
- WILKINS A. Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays*. 17: p. 71–77. 1995.
- WOOD, CM, McDONALD, DG. Global warming: Implications for freshwater and marine fish. *Cambridge Univ. Press, Cambridge*. 425. 1997.
- WOYNAROVICH, E; HORVÁTH, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. *FAO/CODEVASF/CNPq*. 1983.
- WU, CC; TOMY, S; CHANG, CF. The Expression of nr0b1 and nr5a4 During Gonad Development and Sex Change in Protandrous Black Porgy Fish, *Acanthopagrus schlegelii*. *Biology of Reproduction*. 78: p. 200–21. 2008.

- YAMAMOTO, TO. Sex Differentiation. *Fish physiology*. 3: p. 117-175. 1969.
- YASUIKE, M; DE BOER, J; VON SCHALBURG, KR; COOPER, GA; MCKINNEL, L; MESSMER, A; KOOP, BF. Evolution of duplicated IgH loci in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *BMC genomics*. 11(1): 486. 2010.
- YOSHIMOTO, S; OKADA, E ; UMEMOTO, H; TAMURA, K; UNO, Y; NISHIDA-UMEHARA, C; MATSUDA, Y; TAKAMATSU, N; SHIBA, T; ITO, M. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Development Biolog*. 105: p. 2469-2474. 2007.
- YOSHINAGA, N; SHIRAIISHI, E; YAMAMOTO, T; IGUCHI, T; ABE, SI; KITANO, T. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and biophysical research communications*. 322(2): p. 508-513. 2004.
- ZANIBONI FILHO, E; WEINGARTNER, M. Técnicas de Indução da Reprodução de Peixes Migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31(3): p. 367-373. 2007.
- ZHAO, G; YU, QX; ZHANG, WW; ZHANG, YM; CHEN, J; LONG, H; LIU, JD. The 5S rDNA related repetitive sequences in the sex chromosomes of the spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*). *Cytogenetic and Genome Research*. 121(2): p. 143-148. 2008.

