

MARÍLIA DE PAIVA CAMARGO

Regulação endócrina e parácrina do nicho espermatogonial em *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae): O papel do Amh

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2021

RESUMO

CAMARGO, M. P. **Regulação endócrina e parácrina do nicho espermatogonial em *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae): O papel do Amh.** 2021. 95 f. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A espermatogênese em peixes é regulada tanto pelas gonadotropinas Lh (hormônio luteinizante) e Fsh (hormônio folículo estimulante) (regulação endócrina), como, também, por fatores de crescimento (regulação parácrina). Dentre os fatores regulados pelo Fsh, está o hormônio Anti-Mülleriano (Amh), uma glicoproteína pertencente à família Fator de Crescimento Transformante do tipo Beta (TGF β), secretado pelas células de Sertoli e que em algumas espécies está envolvido com a inibição da diferenciação espermatogonial. Para esclarecer a regulação endócrina e parácrina do nicho espermatogonial em espécies nativas, foi utilizado como espécie modelo o Characiforme *Astyanax altiparanae*, o qual tem sido considerado uma espécie modelo neotropical e de grande importância para aquicultura brasileira e com potenciais econômicos e ecológicos. Foi realizado o isolamento e caracterização molecular do cDNA para o Amh por meio de RT-PCR e RACE-PCR, o qual apresentou 2738 pares de bases (pb) de extensão e *open reading frame* (ORF) de 1629 pb. Apresenta, ainda, 5' UTR com 72 pb, 3' UTR com 1014 pb e cauda poli-A de 23 bases. A dedução desta sequência em aminoácidos resulta em uma proteína de 543 aminoácidos. De acordo com análise da árvore filogenética, o Amh de *A. altiparanae* apresentou forte relação com outras espécies de peixes ósseos, especialmente das ordens Characiformes, Cypriniformes, Cichliformes e Perciformes. Foi avaliada a possível alteração de expressão gênica de *amh* ao longo do ciclo reprodutivo de *A. altiparanae* em cativeiro e, os dados demonstraram que há diferença estatística quando comparamos as estações de verão com a de outono e, também, quando comparamos a de outono com a de inverno. Por meio de qPCR também foi avaliada a expressão de *amh* em diferentes órgãos e tecidos de machos e fêmeas de *A. altiparanae* e, embora haja níveis de transcritos nos órgãos como coração, músculo e cérebro de ambos os sexos, os testículos apresentaram níveis maiores de transcritos de *amh*. A localização celular específica de Amh foi analisada

por meio das técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência, utilizando-se o anticorpo policlonal anti-Amh produzido a partir da sequência previamente clonada. Em ambas as técnicas houve imunomarcações em células de Sertoli, as quais envolviam tanto espermatogônias indiferenciadas (Aund), quanto espermatogônias diferenciadas do tipo A (Adiff). O sinal tornava-se fraco ou ausente em células germinativas mais tardias como espermatogônias do tipo B, espermatócitos e espermátides. Por fim, foi realizada cultura de tecido com o objetivo de avaliar a liberação de andrógeno 11-cetotestosterona (11-KT) sob influência de Fsh e Lh, visto que este hormônio também está relacionado com a regulação da espermatogênese e expressão de Amh. Embora o Fsh tenha sido caracterizado como principal hormônio regulador de 11-KT, o Lh se mostrou mais efetivo. Os resultados obtidos trarão melhor compreensão da biologia reprodutiva de *A. altiparanae*, bem como da homeostase da espermatogênese. Além disso, os resultados sobre a regulação do nicho espermatogonial por meio do Amh, darão subsídios em como estes aspectos podem influenciar a autorrenovação e diferenciação das espermatogônias indiferenciadas, possíveis candidatas às espermatogônias-tronco.

Palavras-chave: *Astyanax altiparanae*. Clonagem molecular. Hormônio Anti-Mülleriano. Gonadotropinas. Andrógeno. Espermatogônia indiferenciada.

ABSTRACT

CAMARGO, M. P. **Endocrine and paracrine regulation of the spermatogonial niche in *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae): the role of Amh.** 2021. 95 p. Ph. D. Thesis (Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Spermatogenesis in fish is regulated both by the gonadotropins Lh (luteinizing hormone) and Fsh (follicle-stimulating hormone) (endocrine regulation), as well as by growth factors (paracrine regulation). Anti-Müllerian Hormone (Amh), a glycoprotein belonging to the Transforming Growth Factor Beta (TGF β) family, secreted by Sertoli cells and which in some species is involved in the inhibition of spermatogonial differentiation. To clarify the endocrine and paracrine regulation of the spermatogonial niche in native species, the Characiforme *Astyanax altiparanae* was used as a model species, which has been considered a neotropical model species and of great importance for Brazilian aquaculture with economic and ecological potential. The isolation and molecular characterization of cDNA for Amh was performed by RT-PCR and RACE-PCR, which presented 2738 base pairs (bp) in length and a 1629 bp open reading frame (ORF). It also features a 72 bp 5' UTR, a 1014 bp 3' UTR and a 23-base poly-A tail. The deduction of this sequence into amino acids results in a protein of 543 amino acids. According to the analysis of the phylogenetic tree, the Amh of *A. altiparanae* showed a strong relationship with other bony fish species, especially from the orders Characiformes, Cypriniformes, Cichliformes and Perciformes. The possible alteration of *amh* gene expression during the reproductive cycle of *A. altiparanae* in captivity was evaluated, and the data showed that there is a statistical difference when comparing the summer and autumn seasons, and when comparing the autumn with winter also. Using qPCR, the expression of *amh* was also evaluated in different organs and tissues of males and females of *A. altiparanae* and, although there are transcripts levels in organs such as heart, muscle and brain of both sexes, the testes showed higher levels of transcripts from *amh*. The specific cell localization of Amh was analyzed by means of immunohistochemistry and immunofluorescence techniques, using the anti-Amh polyclonal antibody produced from the previously cloned sequence. In both techniques there were immunostaining in Sertoli cells

which involved both undifferentiated spermatogonia (Aund) and differentiated type A spermatogonia (Adiff). The signal became weak or absent in later germ cells such as type B spermatogonia, spermatocytes, and spermatids. Finally, tissue culture was performed in order to evaluate the release of androgen 11-ketotestosterone (11-KT) under the influence of Fsh and Lh, since this hormone is also related to the regulation of spermatogenesis and Amh expression. Although Fsh has been characterized as the main 11-KT regulatory hormone, Lh has been shown to be more effective. The results obtained will bring a better understanding of the reproductive biology of *A. altiparanae*, as well as the spermatogenesis homeostasis. In addition, the results on the regulation of the spermatogonial niche through the Amh will support how these aspects can influence the self-renewal and differentiation of undifferentiated spermatogonia, possible candidates for stem cell spermatogonia.

Keywords: *Astyanax altiparanae*. Molecular cloning. Anti-Müllerian Hormone. Gonadotropins. Androgen. Undifferentiated spermatogonia.

1 INTRODUÇÃO

Os testículos nos vertebrados exercem tanto a função esteroidogênica ou endócrina, como a espermatogênica para produção de gametas, e a parácrina ou regulatória (Schulz et al., 2010; 2015).

Dentre as células espermatogênicas dos testículos de teleósteos, as espermatogônias indiferenciadas (A_{und}) são consideradas as maiores e apresentam limite celular bem definido (de Paiva Camargo et al., 2017; Leal et al., 2009; Nóbrega et al., 2010; Schulz et al., 2010). De acordo com estudos morfológicos mais detalhados em algumas espécies como *Danio rerio* (Leal et al., 2009; Nóbrega et al., 2010), *Cyprinio carpio* (Oliveira et al., 2021) e em *Astyanax altiparanae* (Camargo, 2016; de Paiva Camargo et al., 2017; Rodrigues et al., 2017), há dois subtipos de espermatogônias indiferenciadas do tipo A_{und} nos testículos – A_{und}^* e A_{und} , ambas consideradas potenciais espermatogônias tronco e dispostas em um microambiente específico conhecido como nicho espermatogonial (Camargo, 2016; de Paiva Camargo et al., 2017).

É sabido que o nicho espermatogonial é formado por fatores de crescimento das células de suporte residentes, incluindo as células de Sertoli e células de Leydig, como também células peritubulares mioídes e vasos sanguíneos (Oatley; Brinster, 2012). E, estudos mostram a importância de fatores extracelulares, seja na forma de hormônios ou de fatores parácrinos, secretados por estas células e que são essenciais na regulação da atividade das espermatogônias-tronco (De Rooij, 2009; Nóbrega et al., 2015; Schulz et al., 2010).

Dentre os fatores que regulam o processo espermatogênico, sejam eles hormonais (regulação endócrina) ou fatores de crescimento (regulação parácrina), estão as gonadotropinas hormônio luteinizante (Lh) e hormônio folículo estimulante (Fsh), ambas produzidas pela hipófise, além de fatores testiculares como, por exemplo, os andrógenos testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) (Amer et al., 2001).

A produção de andrógenos pelas células de Leydig se dá pela clássica regulação do Lh, como em todos os vertebrados. No entanto, em peixes, as células de Leydig também expressam o gene receptor de Fsh – *fshr* e o Fsh tem demonstrado ser um potente hormônio esteroidogênico em várias espécies, como,

por exemplo, em *Danio rerio* (Garcia-Lopez et al., 2010), em *Clarias gariepinus* (Garcia-Lopez et al., 2009) e em *Anguilla japonica* (Ohta et al., 2007). Ainda em peixes, o Fsh atua na diferenciação e proliferação espermatogonial, dando continuidade ao processo espermatogênico (Garcia-Lopez et al., 2009, 2010; Ohta et al., 2007; Schulz et al., 2010).

No entanto, estudos sobre o exato papel do Fsh na espermatogênese são recentes e ainda inconclusivos. De acordo com Oliveira e colaboradores (2021), observou-se que este hormônio está relacionado com a liberação de alguns fatores de crescimento produzidos pelas células de Sertoli, os quais interferem na atividade proliferativa das células germinativas.

Dentre os fatores de crescimento regulados pelo Fsh está o hormônio Anti-Mülleriano (Amh), pertencente à família Fator de Crescimento Transformante do tipo Beta (TGF β). Em testículos de *Danio rerio* adulto, o Amh foi detectado em células de Sertoli envolvendo células germinativas iniciais, como as espermatogônias indiferenciadas do tipo A_{und} e espermatogônia do tipo A diferenciada (A_{diff}). A sua imunodeteção tornou-se menor e até completamente ausente quando as células de Sertoli estavam em contato com células germinativas em estágio mais avançado, como espermatogônias do tipo B, espermatócitos e espermátides.

Evidências como, por exemplo, a citada acima indicam que o Amh possui efeito inibitório no sentido da diferenciação espermatogonial e mantém as células germinativas iniciais em seu estado indiferenciado (Skaar et al., 2011).

Para a realização deste trabalho e para a possível compreensão da regulação endócrina e parácrina do nicho espermatogonial, foi utilizado como espécie modelo o *A. altiparanae*, popularmente conhecido como lambari-do-rabo-amarelo (Garutti e Britski, 2000), espécie de alto potencial econômico e ecológico e de grande importância para aquicultura brasileira.

Os resultados obtidos durante estes anos de pesquisa geraram subsídios para a compreensão da biologia reprodutiva e da homeostase da espermatogênese de *A. altiparanae*, bem como agrega os estudos relacionados à regulação dos processos de autorrenovação e diferenciação das espermatogônias indiferenciadas, possíveis candidatas às espermatogônias-tronco.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho concluiu-se que:

- O cDNA completo de *amh* de *A. altiparanae* é formado por 2738 nucleotídeos de comprimento, sendo que a região codificante (ORF) consiste em 1629 nucleotídeos e, esta sequência codifica uma proteína predita de 543 aminoácidos;
- A sequência de *A. altiparanae* revelou uma identidade nucleotídica com outras espécies de peixes, como *Astyanax mexicanus*, *Ictalurus punctatus*, *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Salmo salar*, *Anguilla japonica*, *Dicentrarchus labrax* e *Odontesthes bonariensis*;
- De acordo com análises da árvore filogenética, há forte relação de Amh de *A. altiparanae* com espécies de peixes de diferentes ordens como Characiformes, Cypriniformes, Cichliformes e Perciformes;
- Existe diferença significativa de expressão de *amh* nos testículos durante o ciclo reprodutivo, considerando-se as fases e estações do ano, uma vez que observamos maior expressão no outono e menor no inverno;
- Há níveis de transcritos de *amh* além do testículo, como no coração, músculo e cérebro, tanto em machos, quanto em fêmeas de *A. altiparanae*, bem como em ovários, embora que em níveis baixos. No entanto, a maior expressão de *amh* ainda se concentrou nos testículos;
- O anticorpo policlonal produzido contra o peptídeo sintético de Amh de *A. altiparanae* resultou em imunomarcações em células de Sertoli as quais envolviam tanto espermatogônias indiferenciadas (Aund), quanto espermatogônias diferenciadas do tipo A (Adiff) e, as imunomarcações tornaram-se fracas e até mesmo ausentes em células germinativas em estágios mais avançados;
- Os testículos após as culturas de 18h (*short-term*) e de 48h (*long-term*) apresentaram morfologia de forma íntegra, visto que as células do epitélio germinativo e as células do interstício encontravam-se normais, dentro do padrão em condições normais;

- O Fsh não apresentou efeito de forma significativa na liberação de 11-KT em explante de testículo de *A. altiparanae*, no entanto, o Lh se mostrou mais efetivo ao analisarmos a liberação deste andrógeno.

REFERÊNCIAS¹

- AMER, M. A.; TAKESHI MIURA, T.; MIURA, C.; YAMAUCHI, K. Involvement of Sex Steroid Hormones in the Early Stages of Spermatogenesis in Japanese Huchen (*Hucho perryi*). **Biology of Reproduction**, vol. 65, p. 1057–1066, 2001.
- ADOLFI, M. C.; CARREIRA, A. C.; JESUS, L. W.; BOGERD, J.; FUNES, R. M.; SCHARTL, M.; SOGAYAR, M. C.; BORELLA, M. I. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 13, v. 2, 2015.
- ADOLFI, M. C.; NAKAJIMA, R. T.; NÓBREGA, R. H.; SCHARTL, M. Intersex, Hermaphroditism, and Gonadal Plasticity in Vertebrates: Evolution of the Müllerian Duct and *Amh/Amhr2* Signaling. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 7, p. 149–172, 2018.
- BARBIERI, G.; SANTOS, M. V. R.; SANTOS, J. M. Época de reprodução peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 7, p. 1057–1065, 1982.
- BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 116–132, 2006.
- BRANCO, G. S. **Caracterização da diferenciação celular durante a morfogênese da hipófise em *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- BRANCO, G. S. **Estudo *in vitro* da hipófise e testículos de *Astyanax altiparanae* (Characiformes:Characidae) e os anti-inflamatórios não esteroidais como desreguladores endócrinos**. 2020. 99 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2020.
- BRANCO, G. S.; MOREIRA, R. G.; BORELLA, M. I.; CAMARGO, M. P.; MUNOZ-PENULA, M.; DAL'OLIO-GOMES, A.; TOLUSSI, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs act as endocrine disruptors in *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) reproduction: An ex vivo approach. **Aquatic Toxicology**, v. 232, 105767, 2021.
- BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, v. 3, p. 52-70, 2011.
- CAMARGO, M. P. **Caracterização das espermatogônias indiferenciadas e dos nichos espermatogoniais em *Astyanax altiparanae* GARUTTI E BRITSKI, 2000**

¹ De acordo com Estilo Vancouver

(Teleostei, Characidae). 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

CASSEL, M. C. P. **Desenvolvimento das modificações morfofuncionais em ovários de *Astyanax altiparanae* GARUTTI E BRITSKI 2000 (TELEOSTEI, CHARACIDAE)**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

CASSEL, M.; CAMARGO, M. P.; JESUS, L. W. O.; BORELLA, M. I. Involution processes of follicular atresia and post-ovulatory complex in a characid fish ovary: a study of apoptosis and autophagy pathways. **Journal of Molecular Histology**, v. 48, n. 3, p. 243–257, 2017a.

CASSEL, M.; CHEHADE, C.; BRANCO, G. S.; CANEPELLE, D.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. Ovarian development and the reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over one year: Applications in fish farming. **Theriogenology**, v. 98, p. 1–15, 2017b.

CHAUVIGNÉ, F.; FATSINI, E.; DUNCAN, N.; OLLÉ, J.; ZANUY, S.; GÓMEZ, A.; CERDÀ, J. Plasma levels of follicle-stimulating and luteinizing hormones during the reproductive cycle of wild and cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 191, p. 35–43, 2016.

CHAUVIGNÉ, F.; OLLÉ, J.; GONZÁLEZ, W.; DUNCAN, N.; GIMÉNEZ, I.; CERDÀ, J. Toward developing recombinant gonadotropin-based hormone therapies for increasing fertility in the flatfish Senegalese sole. **PLoS One**, v. 12, n. 3, e0174387, 2017.

CHEHADE, C.; CASSEL, M.; BORELLA, M. I. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. **Neotropical Ichthyology** (Impresso), v. 13, p. 00–00, 2015.

CHEHADE, C.; AMARAL, F. G. ; BRANCO, G. S.; CASSEL, M.; DE JESUS, L. W. O.; COSTA, F. G.; BORDIN, S. A.; MOREIRA, R. G.; BORELLA, M. I. Molecular characterization of different preproGnRHs in *Astyanax altiparanae* (Characiformes): Effects of GnRH on female reproduction. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, p. 720-734, 2020.

CHI, M. L.; WEN, H. S.; NI, M.; HE, F.; LI, J.F.; QIAN, K.; ZHANG, P.; CHAI, S.H.; DING, Y.X.; YIN, X.H. Molecular identification of genes involved in testicular steroid synthesis and characterization of the responses to hormones stimulation in testis of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*). **Steroids**, v. 84, p. 92–102, 2014.

COSTA, F. G. **Testículo de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000. Estudo morfológico, ultraestrutural e imuno-histoquímico**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

COSTA, F. G.; ADOLFI, M. C.; GOMES, C. C.; JESUS, L. W. O.; BATLOUNI, S. R.; BORELLA, M. I. Testes of *Astyanax altiparanae*: the Sertoli cell functions in a semicyclic spermatogenesis. **Micron**, v. 61, p. 20–27, 2014.

COSTA, G. M. J.; AVELAR, G. F.; REZENDE-NETO, J. V.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; LACERDA, S. M. S. N.; ANDRADE, B. S. C.; THOMÉ, R. G.; HOFMANN, M. C.; FRANÇA, L. R. Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. **PLOS One**, v. 7, n. 8, p. 1–13, 2012.

DENNIS, N. A.; JONES, G. T.; CHONG, Y. H.; VAN RIJ, A. M.; MCLENNAN, I. S.; Serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels correlate with infrarenal aortic diameter in healthy older men: is AMH a cardiovascular hormone? **Journal of Endocrinology**, v. 219, p. 13–20, 2013.

DE PAIVA CAMARGO, M., CASSEL, M.; JESUS, L. W. O.; NÓBREGA, R. H.; BORELLA, M. I. Characterization of undifferentiated spermatogonia and the spermatogonial niche in the lambari fish *Astyanax altiparanae*. **Theriogenology**, v. 96, p. 97–102, 2017.

DE ROOIJ, D. G. The spermatogonial stem cell niche. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, p. 580–585, 2009.

DE ROOIJ, D. G.; GRISWOLD, M. D. Questions about spermatogonia and answered since 2000. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, p. 1085–1095, 2012.

DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SILVA RODRIGUES, M.; NÓBREGA, R. H. Testis structure, spermatogonial niche and Sertoli cell efficiency in Neotropical fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 273, p. 218–226, 2019.

FERNANDINO, J. I.; HATTORI, S. R.; KIMURA, H.; STRÜSSMANN, C. A. SOMOZA, G. M. Expression Profile and Estrogenic Regulation of Anti-Müllerian Hormone During Gonadal Development in Pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a Teleost Fish With Strong Temperature-Dependent Sex Determination. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 3192–3199, 2008.

GARCIA-LOPEZ, A.; BOGERD, J.; GRANNEMAN, J. C.; VAN DIJK, W.; TRANT, J. M.; TARANGER, G. L.; SHULZ, R. W. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 357–365, 2009.

GARCÍA-LÓPEZ, A.; DE JONGE, H.; NÓBREGA, R. H.; DE WAAL, P. P.; VAN DIJK, W.; HEMRIKA, W.; TARANGER, G. L.; BOGERD, J.; SCHULZ, R. W. Studies in Zebrafish Reveal Unusual Cellular Expression Patterns of Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acids in the Testis and Unexpected Functional Differentiation of the Gonadotropins. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2349–2360, 2010.

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. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS Série Zoologia**, v. 13, p. 65–88, 2000.

GOMES, C. C. **Localização das diferentes formas de GnRH no encefálo de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000) e *Danio rerio* (Hamilton, 1822).** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GOMES, C. C.; COSTA, F. G.; BORELLA, M. I. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). **Micron**, v. 52-53, p. 33–38, 2013.

GOMES, C. C. **Caracterização molecular dos GnRHs de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000), seu efeito in vivo, e sua expressão temporal ao longo do estímulo reprodutivo.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. **The Sertoli cell.** Clearwater: Cache River Press, p. 703–739, 1993.

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**, v. 388, n. 1–2, p. 148–158, 2007.

HE, Y.; WANG, X.; WU, X.; ZHU, Y.; YANG, D. Expression profiles of amh and foxl2 in *Schizothorax kozlovi*, and their response to temperature during the early developmental stage. **Journal of Genetics**, v. 97, n. 1, p. 127–136, 2018.

JESUS, L. W. O. **Gonadotropinas e seus receptores em *Astyanax altiparanae* (teleostei, characiformes): caracterização molecular e expressão espaço-temporal durante o ciclo reprodutivo em cativeiro.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

JESUS, L. W. O.; BOGERD, J.; VIECELI, F. M.; BRANCO, G. S.; CAMARGO, M. P.; CASSEL, M.; MOREIRA, R. G.; YAN, C. Y. I.; BORELLA, M. I. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: Molecular characterization, spatiotemporal expression and their possible role on female reproductive dysfunction in captivity. **General and Comparative Endocrinology**, v. 246, p. 150–163, 2017.

JOSSO, N.; DI CLEMENTE, N.; GOUÉDARD, L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 179, p. 25–32, 2001.

JOSSO, N.; BELVILLE, C.; DI CLEMENTE, N.; PICARD, J. Y. AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 4, p. 351–356, 2005.

JOSSO, N., PICARD, J.Y., REY, R., DI CLEMENTE, N. Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. **Pediatric Endocrinology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 347–358, 2006.

KLÜVER, N.; PFENNIG, F.; PALA, I.; STORCH, K.; SCHLIEDER, M.; FROSCHAUER, A.; GUTZEIT, H. O.; SCHARTLL, M. Differential expression of Anti-Müllerian hormone (*amh*) and Anti-Müllerian hormone receptor type II (*amhrII*) in the Teleost Medaka. **Developmental Dynamics**, v. 236, p. 271–281, 2007.

KOULISH, S.; KRAMER, C. R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, v. 254, p. 292–311, 2002.

LACERDA, S. M. S. N.; MARTINEZ, E. R. M.; MURA, I. L. D. D.; DORETTO, L. B.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A.; DIGMAYER, M.; NÓBREGA, R. H.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis and identification of spermatogonial stem cell markers in a Neotropical catfish, Jundiá (*Rhamdia quelen*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 273, p. 249–259, 2019.

LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NÓBREGA, R.H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Histological and stereological evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 177–187, 2009.

LI, Q.; MEI, J.; LI, Z.; ZHANG, X.; ZHOU, L.; GUI, J. F. Distinct and Cooperative Roles of *amh* and *dmrt1* in Self-Renewal and Differentiation of Male Germ Cells in Zebrafish. **Genetics**, vol. 207, n. 3, p. 1007–1022, 2017.

LIN, Q.; MEI, J.; LI, Z.; ZHANG, X.; ZHOU, L.; GUI, J.F. Distinct and Cooperative Roles of *amh* and *dmrt1* in Self-Renewal and Differentiation of Male Germ Cells in Zebrafish. **Genetics**, v. 207, n. 3, p. 1007–1022, 2017.

LUKAS-CROISIER, C., LASALA, C., NICAUD, J., BEDECARRAS, P., KUMAR, T.R., DUTERTRE, M., MATZUK, M.M., PICARD, J.Y., JOSSO, N., REY, R. Follicle-stimulating hormone increases testicular Anti-Müllerian hormone (AMH) production through Sertoli cell proliferation and a non-classical cyclic adenosine 5' monophosphate mediated activation of the AMH Gene. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 4, p. 550–561, 2003.

MATTA, S. L. P.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. The goitrogen 6-npropyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the Tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 970–978, 2002.

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

MORAIS, R. D. V. S.; CRESPO, D.; NÓBREGA, R. H.; LEMOS, M. S.; VAN DE KANT, H. J. G.; DE FRANÇA, L. R.; MALE, R.; BOGERD, J.; SCHULZ, R. W. Antagonistic regulation of spermatogonial differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) by *Igf3* and *Amh*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 1–13, 2017.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 197–206, 2009.

NÓBREGA, R. H.; CAAJ, C. D.; KANT, H. V.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R.W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS One**, v. 5, p. 1–16, 2010.

NÓBREGA, R. H.; MORAIS, R. D. V. S.; CRESPO, D.; WAAL, P. P.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W.; BOGERD, J. Fsh Stimulates Spermatogonial Proliferation and Differentiation in Zebrafish via Igf3. **Endocrinology**, v. 156, p. 1–14, 2015.

OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L. Regulation of Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in Mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 24, p. 263–286, 2008.

OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L. The germline stem cell niche unit in Mammalian testes. **Physiological Reviews**, v. 92, p. 577–595, 2012.

OHTA, T. MIYAKE, H. MIURA, C.; KAMEI, H.; AIDA, K.; MIURA, T. Follicle-Stimulating Hormone Induces Spermatogenesis Mediated by Androgen Production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 970–977, 2007.

OLIVEIRA, M. A. **Nicho espermatogonial em *Cyprinus carpio* e papel do Amh na espermatogênese**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – CAUNESP, Jaboticabal, 2014.

OLIVEIRA, M. A.; MARTINEZ, E. R. M.; BUTZGE, A. J.; DORETTO, L. B.; RICCI, J. M. B.; RODRIGUES, M. S.; VIGOYA, A. A. A.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, N. E.; STEWART, A. B.; NÓBREGA, R. H. Molecular characterization and expression analysis of anti-Müllerian hormone in common carp (*Cyprinus carpio*) adult testes. **Gene Expression Patterns**, v. 40, p. 119169, 2021.

PALA, I.; KLÜVER, N.; THORSTEINSDÓTTIR, S.; SCHARTL, M.; COELHO, M.M. Expression pattern of anti-Müllerian hormone (*amh*) in the hybrid fish complex of *Squalius alburnoides*. **Gene**, v. 410, p. 249–258, 2008.

PFENNIG, F.; STANDKE, A.; GUTZEIT, H.O. The role of Amh signaling in teleost fish – multiple functions not restricted to the gonads. **General and Comparative Endocrinology**, v. 223, p. 87–107, 2015.

POONLAPHDECHA, S.; PEPEY, E.; HUANG, S.–H.; CANONNE, M.; SOLER, L.; MORTAJI, S.; MORAND, S.; PFENNIG, F.; MÉLARD, C.; BAROILLER, J. F.; D’COTTA, H. Elevated *amh* gene expression in the brain of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) during testis differentiation. **Sexual Development**, v.5, p.33–47, 2011.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 67, p. 15–19, 2001.

ROCHA, A.; ZANUY, S.; GÓMEZ, A. Conserved Anti-Müllerian Hormone: Anti-Müllerian Hormone Type-2 Receptor Specific Interaction and Intracellular Signaling in Teleosts. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 6, p. 141, 2016.

RODRÍGUEZ-MARÍ, A.; YAN, YI-LIN; BREMILLER, R. A.; WILSON, C.; CAÑESTRO, C.; POSTLETHWAIT, J. H. Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (Amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. **Gene Expression Patterns**, v. 5, n. 5, p. 655–667, 2005.

RODRIGUES, M. S.; SILVA, D. H. S.; QUIRINO, P. P.; SILVEIRA, A. N.; SILVEIRA, R. V. Spermatogenesis in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: A histological analyses with emphasis to spermatogonial and spermatid types. *Boletim do Instituto de Pesca (Online)*, v. 41, p. 697-705, 2015.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYE, J. J.; LE GAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NÓBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 390–411, 2010.

SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H.; MORAIS, R. D. V. S.; DE WAAL, P. P.; FRANÇA, L. R.; BOGERD, J. Endocrine and paracrine regulation of zebrafish spermatogenesis: the Sertoli cell perspective. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 81–87, 2015.

SCHULZ, R. W.; VISCHERA, H. F.; CAVACOA, J. E. B. .; SANTOS, E. M.; TYLERB, C. R.; GOOSA, H. J. TH.; BOGERD, J. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 129, p. 407–417, 2001.

SKAAR, K. S.; NÓBREGA, R. H.; MAGARAKI, A.; OLSEN, L. C.; SCHULZ, R. W.; MALE, R. Proteolytically Activated, Recombinant Anti-Müllerian Hormone Inhibits Androgen Secretion, Proliferation, and Differentiation of Spermatogonia in Adult Zebrafish Testis Organ Cultures. **Endocrinology**, v. 152, n. 9, p. 3527-3540, 2011.

XIE, X.; NÓBREGA, R. H.; PŠENIČKA, M. Spermatogonial Stem Cells in Fish: Characterization, Isolation, Enrichment, and Recent Advances of In Vitro Culture Systems. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 644, 2020.

YAN, Y. L.; BATZEL, P.; TITUS, T.; SYDES, J.; DESVIGNES, T.; BREMILLER, R.; DRAPER, B.; POSTLETHWAIT, J. H. A Hormone That Lost Its Receptor: Anti-Müllerian Hormone (AMH) in Zebrafish Gonad Development and Sex Determination. **Genetics**, v. 213, n. 2, p. 529–553, 2019.

YOSHINAGA, N.; SHIRAISHI, E.; YAMAMOTO, T.; IGUCHI, T.; ABE, S.; 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**, v. 322, n. 2, p. 508–513, 2004.

WU, G. C.; CHIU, P. C.; LYU, Y. S.; CHANG, C. F. The Expression of *amh* and *amhr2* Is Associated with the Development of Gonadal Tissue and Sex Change in the Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 443–453, 2010.

ZHANG, Z.; ZHU, B.; CHEN, W.; GE, W. Anti-Müllerian hormone (*Amh/amh*) plays dual roles in maintaining gonadal homeostasis and gametogenesis in zebrafish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 517, 110963, 2020.