



ALINE FERREIRA SOUZA DE CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM *Astronotus*
ocellatus: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS,
HORMONAIIS E MOLECULARES**

LAVRAS - MG

2017

ALINE FERREIRA SOUZA DE CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM *Astronotus ocellatus*: ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS, HORMONAIS E MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Luís David Solis Murgas

Orientador

Profa. Dra. Ana Paula Peconick

Coorientadora

LAVRAS - MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Carvalho, Aline Ferreira Souza de .

Identificação do sexo em *Astronotus ocellatus* : aspectos
comportamentais, hormonais e moleculares / Aline Ferreira Souza
de Carvalho. - 2016.

144 p. : il.

Orientadora: Luís David Solis Murgas.

Coorientadora: Ana Paula Peconick.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. Sexagem. 2. Esteróides Sexuais. 3. Molecular. 4.
Comportamento Agressivo. 5. Peixes. I. Murgas, Luís David Solis.
II. Peconick, Ana Paula. III. Título.

ALINE FERREIRA SOUZA DE CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM *Astronotus ocellatus*: ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS, HORMONAIIS E MOLECULARES**

***SEX IDENTIFICATION IN *Astronotus ocellatus*: BEHAVIORAL,
HORMONAL AND MOLECULAR ASPECTS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de dezembro 2016.

Profa. Dra. Daniella Aparecida de Jesus Paula	IF Sudeste MG
Prof. Dr. Paulo dos Santos Pompeu	UFLA
Profa. Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dra. Gilmara Junqueira Machado	UFLA

Prof. Dr. Luís David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS - MG

2017

A Deus, por me guiar e me dar forças, especialmente, nos momentos de angústia. “Meu Senhor e Meu Deus, eu creio, mas aumentai a minha Fé”

Aos meus pais, João Batista de Carvalho e Helena Ferreira Souza de Carvalho, por eles simplesmente serem quem são. Obrigada pela criação espetacular, pelo exemplo de vida, pelo amor incondicional e por toda a felicidade proporcionada a cada dia. Amo vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me guiar e iluminar em cada passo, por me conceder forças em momentos difíceis, por me permitir superar cada medo e angústia que foram tão presentes nesta caminhada. A Ele, entrego a minha vida, com amor e sacrifícios!

Aos meus pais, João e Helena, por tudo que fazem por mim. Não consigo imaginar minha vida sem o apoio de vocês. Obrigada pela maior herança de todas: os meus estudos. Tudo o que conquistei, tudo o que sou, devo a vocês. Obrigada pelos ensinamentos, carinho, amor e união. Acima de tudo, obrigada por acreditarem em mim, especialmente nos meus momentos de fraqueza. Amor incondicional.

Às minhas irmãs queridas, Marina e Carol, por serem minhas melhores amigas por toda a vida. Sem vocês, o caminho seria mais difícil e, com certeza, incompleto. Vocês representam a melhor parte de mim, parceria melhor não podia existir. Obrigada por fazerem o papel de irmãs mais velhas, por cuidarem de mim, proteger e me ensinar a compartilhar. Amo vocês.

Aos meus queridos sobrinhos, João Pedro e Henrique, meus pequenos mais amados, vocês trazem luz aos meus dias, me enchem de ternura e paz. Obrigada por me permitirem conhecer o lado mais singelo do amor! A titia/madrinha ama vocês.

Ao meu amor e noivo Victor, palavras não são suficientes para agradecer tudo o que representa para mim, você é o melhor companheiro que alguém pode sonhar em ter. Obrigada por nunca me deixar desistir, por segurar na minha mão e me fazer seguir adiante. Ao meu lado desde o TCC até a Tese, é aquele que mais me apoiou na construção dos meus sonhos. Você faz parte de cada vitória. Amo você.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, pela oportunidade concedida para realização do doutorado e desenvolvimento do projeto de tese.

À Facultat de Farmacia da Universitat de Barcelona, pela oportunidade de realização do doutorado sanduíche, pela oportunidade de desenvolver meus estudos e aprimorar meus conhecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro na execução dos estudos.

Ao Professor e orientador Luis David Solis Murgas, especial agradecimento, por tudo aquilo que fez por mim nesses longos anos de convivência. Agradeço por confiar em mim, por ter me acompanhado desde a graduação, por me despertar o interesse pela vida acadêmica e, com isso, me apaixonar pela pesquisa. Obrigada por me permitir trilhar uma vida acadêmica de grandes aprendizagens, pelos conselhos e compreensão nos momentos em que mais precisei. Sem sombra de dúvida, grande parte do que sou hoje, profissionalmente e pessoalmente, devo a você. Acima de tudo, agradeço pela amizade! Você sempre será um exemplo de professor e pesquisador para mim!

À Professora Ana Paula Peconick por toda ajuda dispensada a mim e às minhas inúmeras dúvidas com a biologia molecular. Obrigada por despertar em mim o interesse em uma área que antes me parecia tão distante e que hoje gosto tanto. Agradeço ainda pelo carinho e ensinamentos, suas contribuições são sempre enriquecedoras.

À Professora Isabel Vasquez Baanante e ao Professor Isidoro Méton por terem me recebido de braços abertos no Laboratório de Bioquímica i Biologia

Molecular da Universitat de Barcelona. Agradeço imensamente por cada contribuição ao meu crescimento profissional, por terem sido tão atenciosos com uma pessoa até então desconhecida. Vocês fizeram da minha estadia no Laboratório e em Barcelona a melhor possível. Muchas gracias!!

Aos membros da banca, Dra. Gilmara Junqueira Machado, Dra. Daniela Aparecida de Jesus Paula, Dr. Paulo dos Santos Pompeu e Dra. Ana Paula Peconick, pelo tempo dispensado e contribuições para melhoria deste trabalho.

Ao José Gilmar Souza e ao Fábio Raphael Pascoti Bruhn, pelas contribuições com as realizações das estatísticas e ensinamentos que me foram de grande valia para a conclusão deste estudo.

A todos os amigos e membros do NEPAD, pelas horas de trabalho e convivência diária, o que contribuiu imensamente para o meu aprimoramento profissional. Além disso, pelas “horas extras” no postinho, nas festinhas na minha antiga casa, no cantinho especial do Fidélis, na casa do Victor e em outros lugares. Esses momentos tornavam tudo mais “leve”. Vocês são sensacionais!

Ao Fidélis Junior, por sempre estar disponível, ajudando em cada detalhe nas execuções dos experimentos, por conduzir seu trabalho impecavelmente, o que refletia diretamente no trabalho de toda nossa equipe. Muito obrigada.

Aos funcionários do Biotério William César Cortez e Joelson pela dedicação diária, fazendo do nosso local de trabalho um lugar tão bom. Obrigada por tudo!

À Isadora Marques Paiva, especial agradecimento, pela amizade, por compartilhar momentos tão alegres na nossa casa, por ter enlouquecido junto comigo nos meus primeiros passos com a biologia molecular. Por ser meu “braço direito” no Biotério enquanto estive em Barcelona.

À amiga Isadora de Lima Assis, por ser sempre a primeira a se dispor a me ajudar nos experimentos, pelas músicas nos momentos de trabalho e também de diversão. Obrigada por seu jeito divertido de ser que contagia a todos.

À amiga Tássia Flávia Dias Castro por todos os momentos em que estive ao meu lado, sempre disposta a ajudar, por todo carinho em todos os anos de convivência.

A todos os amigos do Laboratório de Biquímica e Biologia Molecular da Universitat de Barcelona, em especial Alberto Saez, Albetó, Jonas, Carlos e Sedigheh, por terem paciência comigo em meus primeiros meses no laboratório em que dizer um simples “buenos días” era tão difícil. Obrigada por me ensinarem cada etapa na execução dos meus ensaios e por compartilharem tanto conhecimento. Agradeço por me permitir crescer e compartilhar culturas tão diferentes. Vocês são inesquecíveis.

Aos meus amigos queridos do intercâmbio, em especial a Silvana, que fizeram o meu doutorado sanduíche tão especial. Além de todo o conhecimento acadêmico, com certeza, conquistei coisas incríveis durante este ano e, sem vocês, não seria tão perfeito.

Aos meus colegas de trabalho da UninCor, por todo apoio na etapa final da construção deste trabalho, por compreenderem minha ausência quando necessário e compartilharem momentos tão agradáveis.

Aos meus queridos alunos, por me permitirem exercer esta profissão tão grandiosa de ser educadora. Agradeço pelos ensinamentos e crescimento a cada dia, vocês fazem valer a pena a escolha que fiz.

Às minhas cidades do coração, Lavras e Barcelona, que foram minhas casas em momentos tão importantes. Mesmo distante da família, pude viver anos incríveis nestes lugares. Obrigada por me acolherem.

RESUMO

Objetivo avaliar diferentes métodos de sexagem para a identificação do sexo em *Astronotus ocellatus*, considerando aspectos comportamentais, hormonais e moleculares. No primeiro experimento, objetivou-se identificar o sexo em *A. ocellatus* adultos por avaliação do comportamento agressivo e perfil de esteroides sexuais. O comportamento agressivo foi avaliado pelo teste do espelho, quantificando-se latência, ataques específicos e ataques totais. A dosagem de testosterona (T) e 17 β -estradiol (E₂) foram determinadas por meio do teste de ELISA. A análise histológica das gônadas foi realizada como padrão ouro de sexagem a fim de validar as técnicas propostas e determinar o estágio de maturação sexual. O Kappa de Cohen foi utilizado para avaliar a concordância entre os métodos de sexagem. Os testes t de Student ou Mann-Whitney foram aplicados para avaliar as possíveis diferenças no comportamento e perfil hormonal. Não foi possível identificar o sexo por meio da avaliação do comportamento agressivo. A determinação da relação T/E₂ possibilitou identificar o sexo com eficácia de 80,56%. Foram também observadas diferenças significativas (p<0,05) nos níveis de T e E₂ entre machos e fêmeas. No segundo experimento, objetivou-se avaliar os genes autossômicos *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* como possíveis candidatos para identificação do sexo em *A. ocellatus*. Para isso, foi realizada a caracterização molecular e a determinação do perfil de expressão gênica dos genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* na gônada de machos e fêmeas. Após eutanásia, coletou-se fragmentos de ovário (n=5) e testículos (n=5) de *A. ocellatus* adultos. Para caracterização molecular, extraiu-se o RNA procedendo-se à síntese do cDNA, sendo este utilizado para amplificação por PCR com *primers* específicos para os genes de interesse. Em seguida, os fragmentos de DNA foram purificados, clonados, sequenciados e analisados filogeneticamente. Para determinar o perfil de expressão gênica, foram desenvolvidos ensaios de RT-qPCR. Foi possível isolar e caracterizar sequências parciais de DNA dos genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a*. A análise filogenética revelou estreita relação entre as sequências de aminoácidos dos genes de interesse em *A. ocellatus* e outras espécies de peixes teleósteos. Perfil de expressão marcadamente influenciado pelo sexo, sendo níveis de transcritos de *Foxl2* (p=0,033) significativamente maiores no ovário em comparação ao testículo. Por outro lado, os níveis de transcritos para *Sox9* e *Wt1a* foram significativamente maiores (p=0,020 e p=0,014) no testículo. Conclui-se que é possível identificar o sexo em *A. ocellatus* por meio da dosagem de esteroides sexuais. Além disso, os genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* podem ser utilizados como possíveis marcadores moleculares do sexo para a espécie em questão.

Palavras-chave: Agressividade. Andrógenos. Clonagem. Estrógenos. Diferenciação sexual. Expressão gênica.

ABSTRACT

This work aimed at assessing different methods to identify sex in *Astronotus ocellatus* considering behavioral, hormonal and molecular aspects. Thus, we ran two experiments: the first one aimed at identifying sex in adult *A. ocellatus* by evaluating their aggressive behavior and sexual steroid profile. Mirror test was used to assess such aggressive behavior and quantify latency, specific attacks and total attacks. Testosterone (T) and 17 β -estradiol (E₂) doses, in turn, were determined by the ELISA test. We used the gold sexing standard to analyze the gonads histologically, validate the techniques proposed, and determine the stages of sex maturation. Choen's Kappa was used to evaluate the concordance between such sexing methods. Student's or Mann-Whitney's *t* tests were applied to assess likely differences in behavior and hormone profile. Identifying sex through aggressive behavior was not possible ($p=0.613$ and concordance rate of 0.069). On the other hand, determining a T/E₂ ratio made it possible to identify with an 80.56% accuracy ($p=0.001$ and concordance rate of 0.571). We also identified significant differences ($p<0.05$) in T and E₂ levels between male and female individuals. The second experiment aimed at assessing autosomal genes *Foxl2*, *Sox9* and *Wt1a* as potential candidates for sex identification in *A. ocellatus*. Therefore, molecular characterization and profile determination of expression of genes *Foxl2*, *Sox9* and *Wt1a* in male and female gonads were carried out. For molecular essays, we collected ovary (n=5) and testicle (n=5) fragments from adult *A. ocellatus*, after euthanasia. Such gonadal fragments were histologically evaluated to confirm their sex. For molecular characterization, we extracted the RNA after cDNA synthesis and amplified it in PCR with specific primers for the genes of interest. Afterwards, the DNA fragments were purified, cloned, sequenced and assessed phylogenetically. To determine the profile of gene expression, RT-qPCR essays were run. It was possible to isolate and characterize partial DNA sequences of genes *Foxl2*, *Sox9* and *Wt1a* (Genbank access number: KT337395, KT337394 and KT337396, respectively). The phylogenetic analysis revealed a close relationship between the amino acid sequences in the genes of interest in *A. ocellatus* and other species of teleost fish. RT-qPCR essays revealed a profile of expression deeply influenced by sex, since the level of transcripts in *Foxl2* ($p=0.033$) were significantly higher in ovaries, as opposed to testicles. On the other hand, the level of transcripts for *Sox9* and *Wt1a* were significantly higher ($p=0.020$ and $p=0.014$) in testicles. Thus, under the conditions of these experiments, it is possible to identify sex in *A. ocellatus* based on sex steroid doses. Moreover, genes *Foxl2*, *Sox9* and *Wt1a* may be used as possible molecular markers for sex in the species at hand.

Keywords: Aggressiveness. Androgynous. Cloning. Estrogens. Sex differentiation. Gene expression.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>Astronotus ocellatus</i>	17
2.2	Comportamento agressivo em peixes	19
2.2.1	Diferenças sexuais no comportamento agressivo em peixes	21
2.2.2	Comportamento agressivo em <i>A. ocellatus</i>	24
2.2.3	Metodologias para avaliação do comportamento agressivo em peixes	25
2.3	Esteroides sexuais em peixes	26
2.3.1	Biossíntese dos esteroides sexuais em peixes	26
2.3.2	Regulação da biossíntese dos esteroides sexuais	29
2.3.3	Funções dos principais esteroides sexuais	30
2.3.3.1	Andrógenos	31
2.3.3.2	Estrógenos	33
2.3.3.3	Progestágenos	35
2.3.4	Identificação do sexo por dosagem de esteroides sexuais	36
2.4	Determinação sexual em peixes	38
2.4.1	Determinação sexual genética	40
2.4.2	Determinação sexual ambiental	43
2.4.3	Diferenciação sexual em peixes	45
2.4.4	Bases moleculares da determinação e diferenciação sexual em peixes	48
2.4.4.1	<i>Foxl2</i>	49
2.4.4.2	<i>Sox9</i>	52
2.4.4.3	<i>Wt1</i>	54
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
	REFERÊNCIAS	59
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	77
	ARTIGO 1 - IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM <i>Astronotus ocellatus</i> POR MEIO DA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO AGRESSIVO E DOSAGEM DE ESTERÓIDES SEXUAIS	77
	ARTIGO 2 - CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES AUTOSSÔMICOS <i>Foxl2</i>, <i>Sox9</i> E <i>Wt1a</i> COMO GENES CANDIDATOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM <i>Astronotus ocellatus</i>	110

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A identificação do sexo em peixes é questão imprescindível para o sucesso da reprodução em cativeiro, seja no âmbito produtivo ou científico. É de fundamental importância para o manejo reprodutivo adequado, contribuindo para a redução do estresse entre os animais em um plantel, redução de gastos com manutenção de matrizes indevidas, aumento da produção de alevinos e, conseqüentemente, ganho econômico. Além disso, é de suma relevância para estudos científicos em diferentes campos, incluindo comportamento, genética e ecologia.

Apesar de sua importância, a identificação do sexo, na maioria das vezes, baseia-se em métodos subjetivos e, em espécies que não apresentam dimorfismo sexual, pode não ser possível tal diferenciação. Frente a estas limitações, o desenvolvimento de estudos que priorizem a definição de métodos de sexagem faz-se necessário. Ademais, é relevante avaliar diferentes abordagens científicas no que diz respeito à diferenciação entre os sexos, haja vistas as vantagens e desvantagens de cada metodologia.

Diferentes técnicas têm sido propostas para a identificação do sexo em peixes podendo-se destacar a avaliação do comportamento agressivo, dosagem de esteroides sexuais e uso de marcadores moleculares. No que diz respeito ao comportamento agressivo, há pouca informação na literatura considerando este parâmetro como método de sexagem. Entretanto, as diferenças sexuais na agressividade fornecem suporte para a investigação desta variável como alternativa de sexagem. Os peixes manifestam sua agressividade por meio de ataques específicos frente a um oponente. Diante disso, considerando que a frequência de ataques difere entre os sexos, este parâmetro pode ser utilizado para distinção entre machos e fêmeas.

A dosagem de esteroides sexuais, por outro lado, já vem sendo investigada como ferramenta valiosa de sexagem em diversos estudos. Os resultados disponíveis, no entanto, indicam que a eficácia da técnica é dependente de diversos fatores, especialmente, particularidades espécie-específica e estágio de desenvolvimento gonadal. Tal técnica de sexagem baseia-se na mensuração dos níveis plasmáticos dos hormônios testosterona (T) e estradiol (E₂), dadas as variações nos níveis plasmáticos destes hormônios entre machos e fêmeas.

Um grande número de trabalhos vem sendo desenvolvido a fim de estabelecer marcadores moleculares para a identificação do sexo em peixes, embora ainda seja restrito a alguns organismos modelo. Dentre os diferentes marcadores moleculares, os genes autossômicos associados à determinação e diferenciação sexual, incluindo os genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1*, apresentam-se como possíveis genes candidatos a serem utilizados como marcadores do sexo. Associado a isso, o passo inicial deve ser a análise do perfil de expressão gênica dos genes candidatos, a fim de determinar a presença ou não de dimorfismo sexual e, assim sendo, defini-los como bons ou não marcadores do sexo.

Astronotus ocellatus, nativa da bacia do rio Amazonas, é uma espécie com crescente interesse e potencial econômico para a aquicultura nacional, especialmente devido às suas características morfológicas notórias, tornando-a atrativa para a aquariofilia. Entretanto, embora se apresente como uma espécie em potencial para cultivo, há poucas informações em diferentes áreas do conhecimento, incluindo reprodução, fisiologia, comportamento e genética. Assim sendo, é necessário definir e priorizar estudos que possam contribuir para a difusão do conhecimento técnico-científico em relação a essa espécie e, conseqüentemente, promover ainda mais o seu crescimento.

A reprodução do *A. ocellatus* baseia-se no acasalamento monogâmico, resultando na formação de casais que permanecem unidos por toda a vida. Em

função disso, é necessária a diferenciação entre os sexos para a formação do plantel de reprodutores considerando a proporção adequada entre machos e fêmeas. Entretanto, a ausência de dimorfismo sexual e cromossomos sexuais heteromórficos podem representar um entrave para a identificação do sexo e subsequente seleção dos reprodutores.

Diante da necessidade de estabelecer métodos de identificação do sexo para a espécie em questão, este estudo propõe o uso de diferentes abordagens de sexagem, considerando aspectos comportamentais, hormonais e moleculares. Dessa forma, o presente trabalho foi conduzido com os objetivos gerais de (1) identificar o sexo em *A. ocellatus* juvenis por meio do comportamento agressivo e dosagem de esteroides sexuais e (2) avaliar os genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1* como possíveis candidatos a marcadores moleculares para identificação do sexo em *A. ocellatus*. Além de contribuir para a identificação do sexo na espécie, o presente estudo fornecerá bases científicas para investigações futuras, promovendo novas perspectivas relacionadas aos diferentes aspectos aqui propostos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Astronotus ocellatus*

A. ocellatus, pertencente à família Cichlidae, da ordem Perciformes, é popularmente conhecida com oscar, apaiari ou acará-açu (PAVANELLI, 2002). É uma espécie nativa da América do Sul, sendo encontrada, originalmente, na bacia do rio Amazonas, incluindo Peru, Colômbia e Brasil (PAVANELLI, 2000). A disseminação da espécie iniciou-se em 1983 em açudes e rios do Nordeste brasileiro pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), sendo atualmente encontrado em quase todo o país (FONTENELE, 1982). Nos Estados Unidos, no sul do Estado da Flórida, há referência de que a espécie é encontrada em grande concentração, cultivada em aquários para pesca esportiva (FURY; MORELLO, 1994).

Com crescente interesse econômico, é uma espécie de grande representatividade para o comércio, principalmente para a aquariofilia devido às suas características morfológicas marcantes. O comportamento da espécie também atrai o interesse dos aquarofisltas, sendo os indivíduos territorialistas e, muitas vezes, agressivos na tentativa de estabelecer posto social em uma hierarquia de dominância (SHACKLETON; JENNIONS; HUNT, 2005). Além disso, é considerado um peixe bastante apreciado para consumo na região Norte e Nordeste do Brasil por apresentar carne saborosa, firme e sem espinhas intramusculares (GURGEL; FREITAS, 1973).

Em relação à sua morfologia, sua coloração varia do marrom ao vermelho-ferrugem, mas não é difícil encontrar indivíduos albinos. Em fase reprodutiva, essa coloração tende a se acentuar, principalmente o carmesim na base do opérculo e nas faixas verticais. As tonalidades marrons mudam para negra, notadamente no dorso e parte superior da cabeça. O corpo apresenta conformação robusta, achatado lateralmente, com regular altura em relação ao

comprimento. A região dorsal é espessa e sem espinhas intramusculares. Já a nadadeira dorsal e anal apresenta espinhos e a nadadeira caudal é arredondada. A cabeça é pequena em relação ao corpo, com olhos grandes e linha lateral interrompida. O que caracteriza a espécie é um ocelo quase circular, de cor preta, orlada de vermelho-carmim, localizado no pedúnculo caudal próximo à inserção da nadadeira caudal (FONTENELE, 1982) (FIGURA 1).

Figura 1 - Exemplar de *Astrontus ocellatus* adulto



Fonte: Arquivo pessoal (2016)

A. ocellatus habitam, preferencialmente, várzeas e pântanos de rios de águas lânticas, sendo geralmente encontradas em meio a detritos lenhosos. É uma espécie preferencialmente gregária, sendo que os alevinos e juvenis nadam em cardumes compactos, no entanto, animais adultos tendem a formar casais específicos e permanecem menos conjuntamente (FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003). Em relação à dieta, é uma espécie onívora, embora seja predominantemente carnívora, alimentando-se principalmente de insetos, crustáceos e pequenos peixes (HONEBRINK, 1990).

Quanto às tolerâncias ecológicas, *A. ocellatus* é bastante tolerante à hipóxia, sendo capaz de sobreviver em concentrações de oxigênio dissolvido

inferiores a 0,4 mg/L (MUUSZE et al., 1998). A temperatura máxima de cultivo pode variar entre 23-34 °C (LOWE-McCONNELL, 1987), sendo a temperatura mínima crítica de, aproximadamente, 13 °C (SHAFLAND; PESTRAK, 1982). A faixa de tolerância do pH, por sua vez, varia em torno de 6-7. Devido à sua distribuição nos trechos médio e superior dos rios da bacia Amazônica, acreditasse que a espécie apresenta tolerância limitada à salinidade (WEBB; MAUGHAN; KNOTT, 2007)

Em relação à reprodução, *A. ocellatus* é uma espécie ovípara, caracterizada por sua desova parcelada, restrita aos meses mais quentes do ano, com temperaturas superiores a 25 °C. Os animais atingem a maturidade a partir de, aproximadamente, 12 cm de comprimento total, sendo a maturidade sexual alcançada em torno de 12 meses (PINTO-PAIVA; HILTON-NEPOMUCENO, 1989). As fêmeas depositam em média 200 a 2000 ovos em substratos, sendo o número de ovos correlacionados positivamente com o tamanho do corpo da fêmea (BEECHING, 1997). A espécie apresenta cuidado biparental, sendo este papel desempenhado especialmente pelas fêmeas. Após a eclosão dos ovos, em torno de 3 a 4 dias, o cuidado parental das larvas permanece por um período de várias semanas (BARENDIS; BARENDIS-VAN ROON, 1992).

Quanto ao comportamento reprodutivo, a espécie apresenta acasalamento monogâmico formando casais que permanecem unidos por toda a vida (BAERENDIS; BAERENDIS-VAN RON, 1992; ENQUIST; JAKOBSSON, 1986). *A. ocellatus* não apresenta dimorfismo sexual marcante, a não ser na época da reprodução, quando algumas características podem diferenciar os sexos (FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003).

2.2 Comportamento agressivo em peixes

A maior parte dos estudos refere-se ao comportamento agonístico em um sentido amplo, incluindo diferentes formas de agressão intraespecífica,

principalmente, associadas às manifestações ofensivas e defensivas de um determinado indivíduo (HSU; EARLY; WOLF, 2006). Entretanto, de uma maneira geral, considera-se como comportamento agonístico qualquer comportamento agressivo entre indivíduos da mesma espécie na qual envolve lutas e disputas por recursos ambientais (KING et al., 1973; PRICE, 1969).

A agressividade é considerada uma característica de aptidão em várias espécies de peixes, sendo sua manifestação variável de acordo com cada indivíduo. A tendência de um determinado indivíduo à agressividade é um importante eixo comportamental que está diretamente associado ao contexto social no qual este indivíduo está inserido (RÉALE et al., 2007; SIH; BELL; JOHNSON, 2004). Além disso, muitas vezes, o comportamento agressivo está associado a outras características comportamentais, tais como ousadia e aptidão (HUNTINGFORD, 1976).

É importante ressaltar que os diferentes padrões de comportamento agressivo podem apresentar motivações diferentes, além de servir a uma variedade de funções e serem expressos em contextos diferentes (HSU; EARLY; WOLF, 2006). A motivação para tal comportamento é variada e pode envolver, dentre outras, competição por recursos alimentares, defesa e competição por território, disputas pelas fêmeas e cuidado parental (ARNOTT; ELWOOD, 2009; ARIYOMO; WATT, 2012; DAVIS; NUFIO; PAPA, 2011; LARSON; O'MALLEY; MELLONI, 2006). Em espécies consideradas sociais, o comportamento agressivo é bastante evidente e está relacionado à sua motivação no estabelecimento de uma posição social dentro de uma hierarquia de dominância (JONHSSON; WINBERG; SLOMAN, 2006).

Independente da motivação, as interações agonísticas são muitas vezes necessárias e vitais para o sucesso reprodutivo e sobrevivência dos animais (SHACKLETON; JENNIONS; HUNT, 2005). Assim, geralmente os animais mais agressivos são aqueles que apresentam maior sucesso, comparados aos seus

co-específicos menos agressivos (SMITH; BLUMSTEIN, 2006). Embora o comportamento agressivo seja necessário dentro de um contexto social, em determinadas situações, pode resultar em prejuízos funcionais aos animais envolvidos em combates diádicos. Tais prejuízos incluem, por exemplo, gastos energéticos (HALLER, 1991), maior risco de predação (WOLF et al., 2007) e risco de lesões graves (HURD, 1991; TUBERT et al., 2012).

Há uma variedade considerável de manifestações agressivas e, cada uma delas, apresenta um determinado significado que, nem sempre é fácil de detectar. Por exemplo, as mordidas em um oponente representam, quase sempre, uma disputa extremamente agressiva, resultando em ferimento ou morte do rival, sendo assim considerada uma atividade de ataque. Por outro lado, a exibição lateral na qual a área lateral é exposta ao oponente pode refletir tanto em um comportamento de corte como um comportamento agonístico (BEECHING, 1997). Outros exemplos de manifestações agressivas incluem: perseguições, ataques rápidos de natação em direção a um oponente, mordidas e exibições com as nadadeiras eretas (GERLAI et al., 2000; SPENCE et al., 2008).

Além das variações interespecíficas, uma série de outros fatores também exerce influência no comportamento agressivo, destacando-se as seguintes variáveis: sexo (ARCHARD; BRAITHWAITE, 2011), status social ou subordinação (O’CORNNELL; DING; HOFMANN, 2013), tamanho dos animais (ARNOTT; ELWOOD, 2009), maturidade sexual (JOHNSSON; SERNLAND; BLIXT, 2001), isolamento social (GONÇALVES-DE-FREITAS; MARIGUELA, 2006) e diferenças genéticas inerentes a cada indivíduo (JOHNSSON; AKERMAN, 1998).

2.2.1 Diferenças sexuais no comportamento agressivo em peixes

Como destacado anteriormente, diferente são os fatores que podem afetar a manifestação do comportamento agressivo em peixes. Dentre estes

fatores, as diferenças sexuais devem ser aqui destacadas, visto a sua importância para estudos de identificação do sexo (GOMES; FANTINATO; BERNARDI, 2009). Além disso, em algumas situações, o sexo pode ser considerado como o único fator determinante da agressividade em peixes (ARNOTT; ELWOOD, 2009).

Considerando-se as diferenças sexuais na manifestação da agressividade, os resultados disponíveis na literatura indicam que o sexo pode ou não ser um fator determinante, sendo esta uma característica espécie-específica. Por exemplo, diferenças no comportamento em função do sexo foram observadas em *Brachyrhaphis episcopi* (ARCHARD; BRAITHWAITE, 2011), acará do Congo (*Amatitlania nigrofasciata*) (ARNOTT; ELWOOD, 2009), acará (*Cichlasoma dimerus*) (TUBERT et al., 2012), peixe betta (*Betta splendens*) (KARINO; SOMEYA, 2007), truta marrom (*Salmo trutta*) (JOHNSSON; SERNLAND; BLIXT, 2001) e tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) (BALSHINE-EARN; McANDREW, 1995). Em contrapartida, em outras espécies, ambos os sexos demonstram perfil semelhante no comportamento agonístico, como observado em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (PINHO-NETO et al., 2014).

Outro aspecto a ser considerado é o fato de que, dependendo da espécie, o macho é mais agressivo e, em outras, ocorre o contrário, sendo as fêmeas mais agressivas. Além disso, as motivações e o contexto em que ocorrem também podem variar. Por exemplo, em *Brachyrhaphis episcopi* as diferenças observadas entre machos e fêmeas dependem do nível de predação, sendo as fêmeas mais agressivas em populações de baixa predação e os machos em populações de alta predação (ARCHARD; BRAITHWAITE, 2011).

Em acará do Congo (*Amatitlania nigrofasciata*) as diferenças na agressividade entre os sexos se devem principalmente às diferenças táticas. Em fêmeas, maior frequência de movimentos agressivos frontais e de mordida foi observada, enquanto para os machos observou-se maior frequência de ataques

laterais e de cauda (ARNOTT; ELWOOD, 2009). Em tilápia (*Sarotherodon melanotheron*) (BALSHINE-EARN; McANDREW, 1995) e acará (*Cichlasoma dimerus*) (TUBERT et al., 2012), as fêmeas são mais agressivas devido, principalmente, ao cuidado parental. Em contrapartida, em peixe betta (*Betta splendens*) (KARINO; SOMEYA, 2007) e truta marrom (*Salmo trutta*) (JOHNSON; SERNLAND; BLIXT, 2001) os machos são mais agressivos.

Entre as especulações dos fatos que justificam as diferenças sexuais na agressividade, recentes estudos têm levantando a hipótese da participação do fenômeno da lateralização (ARIYOMO; WATT, 2013; ARNOTT; ELWOOD, 2009). A lateralização refere-se ao evento pelo qual se observa preferência por um lado do corpo sobre outro, típico dos seres humanos, mas que também tem sido relatado em outros vertebrados, incluindo os peixes (ARIYOMOTO; WATT, 2013; FRASNELLI; VALLORTIGARA; BORGES, 2012). Tal evento foi observado em acará do Congo (*Amatitlania nigrofasciata*), onde os machos, devido à maior laterização, exibem maior quantidade de ataques laterais quando comparadas as fêmeas, associado à tendência em utilizar apenas um olho para a agressão (ARNOTT; ELWOOD, 2009). De maneira semelhante, em zebrafish (*Danio rerio*), os machos apresentaram também maior grau de lateralização no comportamento agressivo, utilizando-se mais o olho esquerdo em ataques agonísticos, o que pode indicar uma vantagem de aptidão para os machos (ARIYOMO; WATT, 2013).

Considerando que, em diferentes espécies de peixes, o comportamento agressivo é controlado, em parte, pelo sexo, pode-se considerar este parâmetro para a diferenciação entre machos e fêmeas. Na literatura, apenas um trabalho foi encontrado utilizando o comportamento agressivo como método de sexagem. No referido estudo, este método de sexagem foi eficaz, possibilitando a diferenciação sexual em neon goby (*Elacatinus sp*) (GOMES; FANTINATO; BERNARDI, 2009). Esta espécie apresenta comportamento reprodutivo

monogâmico (WHITEMAN; CÔTE, 2003) e, quando introduzido um terceiro exemplar, os machos demonstram comportamento agressivo.

2.2.2 Comportamento agressivo em *A. ocellatus*

Considerando o comportamento em *A. ocellatus*, esta é uma espécie conhecida por estabelecer interações agonísticas e acasalamento monogâmico. Sua agressividade é motivada, principalmente, pelo estabelecimento de uma posição social dentro de uma hierarquia de dominância e também pela defesa do território (BAERENDS; BAERENDS-VAN RON, 1992; ENQUIST; JAKOBSSON, 1986). Por ser considerada uma espécie agressiva, muitas vezes, é mantida em isolamento social pelos aquarofilistas (GONÇALVES-DE-FREITAS; MARIGUELA, 2006).

O comportamento social do *A. ocellatus* foi avaliado por Beeching (1997) e, por meio deste estudo, uma série de manifestações agonísticas foi estabelecida, entre os quais destacam-se: “*display lateral*”, evidenciado pela exibição lateral do animal a um oponente, sendo referido como atividade agressiva de baixa intensidade (KOOPS; GRANT, 1993); “*tail bit*”, caracterizado por manifestações em que o animal morde a cauda do oponente; “*frontal display*”, caracterizada por ataque frontal ao oponente e “*head bit*”, caracterizada por mordida na cabeça, sendo esta última considerada uma manifestação agressiva de alta intensidade (BEECHING, 1997).

De maneira semelhante, em estudo realizado por Gonçalves-de-Freitas e Mariguela (2006), onde se avaliou o comportamento agressivo por meio do teste do espelho em *A. ocellatus*, diferentes eventos agonísticos foram definidos, com padrão similar ao relatado por Beeching (1997). Assim, quatro diferentes eventos agressivos foram registrados: “*mouth fighting*”, comportamento considerando extremamente agressivo, em que o ataque ao oponente é realizado com a boca; “*butting*”, o animal apenas se aproxima do oponente e o toca com a

boca; “*tail beating*”, em que o animal manifesta sua agressividade através do movimento da cauda contra o oponente e “*frontal display*”, na qual o animal manifesta a agressividade por meio de exibição frontal direcionada ao oponente (GONÇALVES-DE-FREITAS; MARIGUELA, 2006).

Embora não se tenha muita informação disponível na literatura, os resultados dos estudos anteriormente citados permitem identificar alguns fatores que contribuem para o comportamento agonístico nesta espécie. Primeiramente, o tamanho dos animais co-específicos envolvidos em um combate diádico influencia diretamente no nível de agressividade. Assim, quando os animais apresentam tamanhos semelhantes em interações agonísticas a competição se torna simétrica e, conseqüentemente, aumenta a agressividade em *A. ocellatus* (BEECHING, 1997).

Em segundo lugar, outro importante fator que contribui para a agressividade em *A. ocellatus* é o isolamento social. Em estudo realizado por Gonçalves-de-Freitas e Mariguela (2006) foi observado que o isolamento social é capaz de aumentar a motivação agressiva, evidenciada por aumento na frequência dos ataques de “*mouth fighting*” (GONÇALVES-DE-FREITAS; MARIGUELA, 2006). Este tipo de ataque é considerado de alta intensidade, uma vez que, tende a durar por mais tempo. Assim, o aumento na frequência de “*mouth fighting*” é um bom indicador de agressividade em *A. ocellatus* (BEECHING, 1997; GONÇALVES-DE-FREITAS; MARIGUELA, 2006). Além disso, segundo Gonçalves-de-Freitas e Mariguela (2006) a agressividade nesta espécie é mediada pelo efeito da exposição prévia, residência prévia ou por processos que envolvam co-específicos.

2.2.3 Metodologias para avaliação do comportamento agressivo em peixes

Em relação aos métodos disponíveis para avaliação do comportamento agonístico em peixes, duas abordagens principais têm sido relatadas, sendo

estas, o teste do espelho e combates diádicos. Em relação ao primeiro teste, este tem sido amplamente empregado para a quantificação da agressividade e baseia-se na capacidade do espelho em fornecer a imagem de um indivíduo co-específico, mimetizando assim, o comportamento do animal (ARIYOMO; WATT, 2013; DESJARDINS; FERNALD, 2010; MORETZ; MARTINS; ROBISON, 2007). A principal vantagem deste teste é o baixo desafio, evitando interações agressivas entre dois oponentes e, assim sendo, permite maior controle sobre a resposta (ARCHARD; BRAITHWAITE, 2011). Embora não permita uma interação agonística real, há estudos que demonstram que o teste do espelho é capaz de mimetizar fielmente um oponente real (ARIYOMO; WATT, 2013; HIRSCHENHAUSER et al., 2004).

A metodologia do combate diádico, também definido como emparelhamento de pares, baseia-se na avaliação da agressividade de um animal em relação ao seu comportamento frente a um oponente. Diferente do teste do espelho, na qual se avalia a interação com uma imagem, o teste diádico mede a interação do animal diretamente com um co-específico. Como desvantagem, pode-se destacar o maior desafio para o animal. Entretanto, é capaz de fornecer informação completa sobre o oponente, considerando interações visuais e químicas (ARIYOMO; WATT, 2013).

2.3 Esteroides sexuais em peixes

A seguir, será apresentada breve revisão sobre os principais esteróides sexuais, considerando sua biossíntese, regulação da síntese e os principais esteróides sexuais e suas funções em peixes teleósteos.

2.3.1 Biossíntese dos esteroides sexuais em peixes

Os hormônios esteroides desempenham papel importante no sistema endócrino de todos os vertebrados, exercendo diversas funções no organismo. Suas ações incluem participação em uma série de processos fisiológicos

importantes, tais como, regulação do balanço hídrico e mineral, modulação da resposta imune e regulação de vários aspectos reprodutivos (TOKARZ et al., 2015). É considerável a diversidade de hormônios esteroides, no entanto, podem-se destacar três grupos principais: esteroides com 21 átomos de carbono (esteroides C21), esteroides com 19 átomos de carbono (esteróide C19) e esteroides com 18 átomos de carbono (esteroides C18) (PANKHURST, 2008).

Os esteroides C21 são representados pelos corticosteroides, com função primária na regulação do metabolismo e osmorregulação, e pelos progestágenos, que exercem papel primário nas atividades reprodutivas em machos e fêmeas (SCHULZ et al., 2010). Os esteroides C19, coletivamente denominados de andrógenos, são comumente considerados como esteroides masculinos, entretanto, são capazes de regular um conjunto de características reprodutivas em ambos os sexos (PANKHURST, 2008). Por sua vez, os esteroides C18, que constitui o grupo dos estrógenos, embora possa ser sintetizado em ambos os sexos, são encontrados em níveis mais elevados em fêmeas, com função primordial na reprodução (LUBZENS et al., 2010).

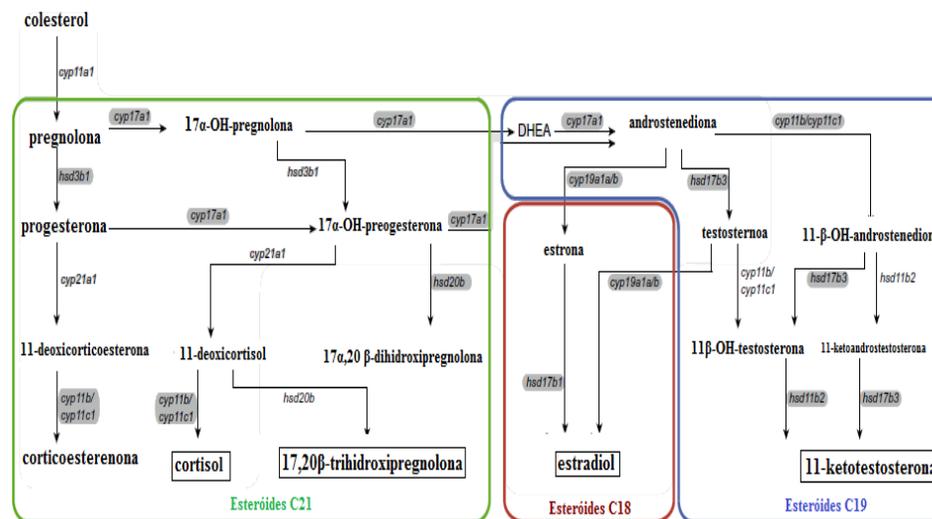
De acordo com a função que exercem e o local onde são sintetizados, os progestágenos, andrógenos e estrógenos são considerados como esteroides sexuais. Em cada uma destas classes, há uma série de hormônios que desempenham papel fundamental na regulação do crescimento e maturação gonadal, como será descrito mais adiante. Os esteroides sexuais são sintetizados, principalmente, nas gônadas, sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Em peixes, estes hormônios são sintetizados nas células foliculares do ovário e nas células de Leydig dos testículos de fêmeas e machos, respectivamente (PANKHURST, 2008).

Em todos os vertebrados, a biossíntese dos esteroides sexuais ocorre por meio de uma sequência sucessiva de clivagens enzimáticas utilizando estoques intracelulares de colesterol, molécula esta que atua como precursor imediato.

Esta sequência de eventos envolve a perda de átomos de carbono e remoção ou adição de vários grupos ativos (PANKHURST, 2008). Inicialmente, a etapa chave na síntese dos esteroides envolve a transferência do colesterol para a membrana interna da mitocôndria, mediada pela proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) (MILLER; BOSE, 2011). Em seguida, uma série de enzimas, em eventos sequenciais, promove a modificação do esqueleto de carbono, adicionando e modificando grupos funcionais (TOKARZ et al., 2015).

O primeiro esteroide a ser formado na via de clivagem é a pregnolona (esteroide C21), por meio da clivagem do carbono-6 da cadeia lateral da molécula de colesterol. Em seguida, a pregnolona pode seguir duas rotas diferentes, sendo convertida a progesterona ou a 17α -hidroxipregmolona. O subsequente destino metabólico da progesterona ou 17α -hidroxipregmolona irá depender da extensão do tecido e do tipo de espécie envolvida. Embora haja diferenças específicas de acordo com as diferentes espécies de peixes, considera-se um esquema geral para a produção dos esteroides em peixes (FIGURA 2). Os principais produtos finais produzidos pela cascata enzimática durante a gametogênese e crescimento gonadal são: 11-ketotestosterona (11-KT) em machos, 17β estradiol (E_2) em fêmeas e o $17,20\beta$ -trihidroxipregmolona ($17,20\beta$ P) em ambos os sexos (NAGAHAMA, 2000).

Figura 2 - Vias postuladas da esteroidogênese em peixes, considerando os três principais grupos de esteroides. Abreviações: cyp, citocromo P450; DHEA, desidroepiandrosteron; hsd, hidroxisteróide desidrogenase; OH-, hidroxí.



Fonte: Adaptação de Tokarz et al. (2015).

2.3.2 Regulação da biossíntese dos esteroides sexuais

Em relação à biossíntese e secreção dos esteroides sexuais, estes são regulados, principalmente, pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Adicionalmente, a ação dos hormônios esteróides sofre influências dos seus próprios mecanismos de *feedback*, além de interagir com outros eixos endócrinos. Estes mecanismos atuam em conjunto na coordenação dos diferentes eventos associados à reprodução (LILEY; STACEY, 1983). A respeito deste eixo, em todos os vertebrados, incluindo os peixes, a reprodução é controlada pelas gonadotrofinas hipofisárias (GTHs) em resposta à estimulação hipotalâmica pela liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Tanto em mamíferos como em peixes estão presentes dois diferentes hormônios gonadotrópicos, sendo estes, hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio

luteinizante (LH), que estimulam importantes funções reprodutivas em ambos os machos e fêmeas (PANKHURST, 2008).

De uma maneira geral, ambas as gônadas masculinas e femininas representam os órgãos alvos de atuação das GTHs, que regulam as funções testiculares e ovarianas, respectivamente. Nas gônadas, as GTHs controlam dois processos distintos que são chaves para a reprodução, sendo estes: produção de esteroides sexuais (esteroidogênese) e produção dos gametas (gametogênese). Assim, a maior parte das ações testiculares e ovarianas é mediada pelos esteroides sexuais sintetizados em resposta às GTHs (MOLES et al., 2007).

Em machos, a síntese dos esteroides sexuais ocorre nas células de Leydig, sendo diretamente regulada pela ação de ambos os hormônios LH e FSH, uma vez que, estão presentes nestas células receptores para ambos os hormônios (PLANAS; SWANSON; DICLHOFF, 1993). Nas fêmeas, a produção folicular dos esteroides sexuais segue o modelo proposto por Nagahama et al. (1994). De acordo com este modelo, a atividade esteroidogênica é coordenada por duas camadas foliculares, a teca e a granulosa, sendo orquestrada pela ação das GTHs. Na camada da teca, as GTHs estimulam a produção de T e 17α -hidroxiprogesterona (17-OHT), sendo subsequentemente convertida em E_2 e $17,20\beta$ -P na camada da granulosa, também em resposta às GTHs, durante a vitelogênese e maturação dos ovócitos, respectivamente (NAGAHAMA et al., 1994).

2.3.3 Funções dos principais esteroides sexuais

Os esteroides sexuais, como destacado anteriormente, podem ser incluídos em três grandes categorias, andrógenos, estrógenos e progestágenos, cada um deles com funções específicas. A seguir, serão apresentadas as principais funções dos principais esteroides sexuais em peixes, que desempenham importante papel na fisiologia reprodutiva.

2.3.3.1 Andrógenos

Os hormônios androgênicos, da classe dos esteroides C19, estão presentes e exercem funções específicas em ambos os sexos, embora comumente seja definido como hormônio masculino. Assim, os andrógenos devem ser considerados pela sua capacidade de regular as características reprodutivas tanto em machos quanto em fêmeas (PANKHURST, 2008; SCHULZ et al., 2010). Entre suas funções gerais, pode-se destacar a regulação do crescimento gonadal e desenvolvimento das características sexuais em machos e efeito central no comportamento e funções hipotalâmicas e hipofisárias em ambos os sexos (PANKHURST, 2008). Além disso, há evidências recentes que demonstram a influência dos andrógenos na ovogênese (KORTNER et al., 2008; KORTNER; ROCHA; ARUKWE, 2009).

Na maioria dos animais vertebrados, o hormônio dihidrotestosterona (DHT) é fisiologicamente o principal andrógeno presente (PANKHURST, 2008). Entretanto, em peixes, o 11-KT é comumente considerado o principal andrógeno circulante (BORG, 1994), sendo muitas vezes o esteroide sexual fisiologicamente ativo, bem como, o mais potente (PANKHURST, 2008). Não obstante a isso, deve-se considerar a presença de outros andrógenos que também exercem importante papel na fisiologia reprodutiva, tais como, testosterona (T), androstenediona (A) e, até mesmo, o DHT (MARGIOTA-CASALUCI; SUMPTER, 2011). De fato, em algumas espécies de peixes, incluindo, por exemplo, os membros da família dos poecilídeos, o 11-KT não representa o principal hormônio ativo, com baixos níveis de produção (PANKHURST, 2008; TOKARZ et al., 2013).

Em machos, independentemente do tipo predominante de andrógeno, estes são sintetizados, principalmente, nas células de Leydig em resposta à ação das GTHs. Entretanto, outros tecidos extra-gonadais, como por exemplo, a interrenal, também é capaz de converter os precursores esteroides em 11-KT e T

(ARAI; TAJIMA; TAMAOKU, 1969). Em relação ao mecanismo de ação dos hormônios androgênicos, seus efeitos são mediados pela ligação aos receptores de andrógenos localizados nas células de Sertoli (IKEUCHI et al., 2001).

Considerando as diferentes funções dos andrógenos em machos, a principal delas é sua participação na espermatogênese (SCHULZ et al., 2010), regulando a proliferação e diferenciação de espermatogônias e formação dos espermatócitos nas fases iniciais da produção dos gametas (NAGAHAMA, 1994). Além disso, exercem efeito também na espermição e hidratação do sêmen, embora os mecanismos sejam pouco compreendidos (PANKHURST, 2008).

Além do efeito primário no controle da espermatogênese, em todos os vertebrados, os andrógenos exercem também significativo efeito no desenvolvimento das características sexuais secundárias em machos. Em peixes, o 11-KT é o andrógeno fisiologicamente mais importante em estimular as características sexuais e também o comportamento reprodutivo (BORG, 1994; PANKHURST, 2008).

Em fêmeas, o efeito primário dos andrógenos é fornecer substrato para a síntese de esteroides C18, especialmente E₂. Assim sendo, a T é convertida em E₂ pela ação da enzima aromatase P450 (PANKHURST, 2008). Entretanto, são também capazes de regular o crescimento e desenvolvimento dos ovócitos durante a fase pré-vitelogênica (KORTNER et al., 2008). Este fato foi evidenciado em estudos *in vitro* em que a exposição dos ovócitos ao 11-KT é capaz de induzir o crescimento e desenvolvimentos dos mesmos, indicando sua participação neste processo (LOKMAN et al., 2007). Além disso, o mesmo foi observado também em estudos *in vivo*, em que a exposição dos peixes a diferentes andrógenos (11-KT e T) resultou em crescimento e desenvolvimento precoce de ovócitos pré-vitelogênicos (KORTNER; ROCHA; ARUKWE, 2009).

2.3.3.2 Estrógenos

Os esteroides C18, denominados em conjunto de estrógenos, podem ser sintetizados em ambos os sexos (SCHULZ et al., 2010), no entanto, ocorre em níveis mais elevados em fêmeas, associado às funções principais que realizam. Tais funções incluem, de uma maneira geral, regulação do desenvolvimento e crescimento ovariano, desenvolvimento de características sexuais secundárias e síntese hepática dos precursores do vitelo e proteínas da membrana ovocitária (PANKHURST, 2008).

Em peixes, considerando a maior parte das espécies, o principal estrógeno envolvido na fisiologia reprodutiva é o E₂, sendo este o esteroide fisiologicamente ativo em fêmeas (TOKARZ et al., 2015). Entretanto, em algumas espécies, a estrona (E₁) também pode estar presente (TYLER; SANTOS; PRAT, 2000). O E₂ é secretado pelas células foliculares e pelas células de Leydig em resposta à estimulação do FSH sendo, em seguida, carregado pela circulação até os órgãos alvos (NAGHAMA; YAMASHITA, 2008). Em relação aos mecanismos de ação, os estrógenos se ligam a receptores nucleares específicos que, em peixes, apresentam três subtipos principais (α , β_1 e β_2). Tais receptores são expressos em diferentes locais, como o fígado, ovário e testículo (PANKHURST, 2008).

Em fêmeas, os hormônios estrogênicos, juntamente com outros esteroides sexuais e com as GTHs, são os principais fatores endócrinos responsáveis pela regulação do crescimento e desenvolvimento dos ovócitos (LUBZENS et al., 2010). Sendo assim, durante as fases iniciais de crescimento, o E₂ estimula as primeiras divisões mitóticas das ovogônias (MIURA et al., 2002). Em seguida, durante o crescimento secundário, o E₂ estimula a síntese de alvéolos corticais nos ovócitos (KWOK et al., 2005). Não diferente a importância do E₂ nas fases iniciais da ovogênese, participação maior deste hormônio é observada durante a fase de vitelogênese. Isto se deve ao fato de que,

em fêmeas, o papel primordial dos estrógenos é estimular a síntese hepática da vitelogenina (Vtg). A Vtg é uma fosfolipoproteína precursora dos constituintes do vitelo, responsável por fornecer suporte nutricional ao desenvolvimento do embrião (PANKHURST, 2008).

Após síntese, o E_2 é transportado até o fígado onde se liga a receptores nucleares. Em seguida, o complexo E_2 -receptor se liga à região promotora do gene da *Vtg*, iniciando assim, sua síntese (OKUMURA et al., 2002). Posteriormente, a *Vtg* é transportada até o ovócito por endocitose (NAGAHAMA et al., 1994; OKUMURA et al., 2002). A vitelogênese corresponde ao maior evento responsável pelo crescimento dos ovócitos e ocorre em resposta, principalmente, pelo aumento na secreção de FSH (CLELLAND; PENG, 2009).

Por fim, não menos importante, o E_2 em fêmeas também estimula a síntese hepática dos precursores de três importantes proteínas estruturais denominadas ZP. Estas proteínas são responsáveis pela formação da zona pelúcida do ovócito em desenvolvimento e, subsequentemente, pela formação da membrana do córion no embrião formado (PANKHURST, 2008). Os genes que codificam para ZP apresentam-se altamente sensíveis aos estrógenos, indicando a participação destes hormônios em sua síntese (FUJITA et al., 2004).

Embora seja comumente considerado como hormônio feminino, o E_2 exerce importante papel fisiológico nos machos. Normalmente, a concentração de E_2 é baixa, sendo observado um aumento transitório durante o ciclo reprodutivo (SCHULZ et al., 2010). Entre as principais funções exercidas pelo E_2 em machos, destacam-se: regulação da esteroidogênese e espermatogênese (LEGAC et al., 2008). Na esteroidogênese, o E_2 atua na regulação de enzimas-chaves nas vias metabólicas, tais como, StAR, 3β HSD e aromatase (LEGAC et al., 2008). Em relação à espermatogênese, o principal efeito do E_2 é estimular a renovação das células-tronco espermatogônicas (MIURA et al., 2002).

2.3.3.3 Progestágenos

Os progestágenos são substâncias que fazem parte do grupo dos esteroides C21 com efeito direto na atividade reprodutiva, tanto em fêmeas quanto em machos. Em peixes, os progestágenos são de grande relevância, principalmente por exercerem potencial atividade maturacional. Diferentes esteroides C21 possuem esta função, sendo denominados como esteroides maturacionais. Entre os diferentes progestágenos, os hormônios 17,20βP e 17,20β,21-trihidroxipregmolona (20βS) são aqueles que apresentam maior atividade maturacional (PANKHURST, 2008).

Em fêmeas, ambos os hormônios 17,20βP e 20βS apresentam papel fundamental na maturação final dos ovócitos, sendo a sua síntese e aumento nos níveis plasmáticos coincidentes com esta fase. Imediatamente antes da maturação final dos ovócitos, ocorre uma mudança dramática da via esteroidogênica, caracterizada por diminuição na expressão da aromatase P450 e aumento na atividade de 20β-HSD nas células da granulosa e da teca (BOBE et al., 2006; NAKAMURA et al., 2005). Como consequência desta alteração, observa-se alteração da produção de E₂ para 17,10βP e 20βS nos folículos ovarianos, com subsequente aumento nos níveis plasmáticos destes hormônios (LUBZENS et al., 2010). Estes eventos são coordenados diretamente pelo aumento agudo nos níveis de LH, sendo seu efeito principalmente na redução da atividade da enzima P450_{SCC} (NAKAMURA et al., 2005; NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008).

Os esteroides maturacionais estimulam todos os processos necessários para que ocorra a maturação ovocitária, especialmente o retorno à meiose dos ovócitos após a completa vitelogênese, caracterizada pela migração e quebra da vesícula germinativa (PANKHURST, 2008). Ao final da maturação, ocorre a ovulação e liberação do ovócito maduro no oviduto ou na cavidade do corpo, onde aguardam o momento da ovoposição. Este evento também está sob

influência do hormônio 17,20βP, possivelmente associado à sua capacidade de estimular a liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), em resposta ao LH (GOETZ; GARCYNISKI, 1997).

Em machos, os hormônios maturacionais também exercem funções importantes na reprodução. Ao final da espermatogênese, assim como observado em fêmeas, ocorre alteração na via esteroidogênica, sob estímulo do LH (TOKARZ et al., 2015). Como resultado, diminui a síntese dos andrógenos, especialmente 11-KT, e aumenta a síntese de 17,20βP e 20βS (SAKAI et al., 1989). Assim sendo, ambos os hormônios participam dos processos finais de maturação dos espermátócitos e liberação dos espermatozoides para o ducto espermático (espermição). Além disso, atuam também na indução da produção do plasma seminal e ativação da motilidade espermática por meio de modulações no pH e fluidez do plasma (SCOTT; SUMPTER; STACEY, 2010).

2.3.4 Identificação do sexo por dosagem de esteroides sexuais

A dosagem dos esteroides sexuais já vem sendo investigada como método valioso de sexagem em diferentes espécies de peixes, tais como, salmão (*Salmo salar*) (POTTINGER et al., 2005), esturjão (*Acipenser persicus*) (VIAYEH et al., 2006), pirarucu (*Arapaima gigas*) (CHU-KOO et al., 2009), cherne azul (*Polyprion oxygeneios*), (KOHN et al., 2013), beluga (*Huso huso*) (NAZERI et al., 2014). O principal atrativo para uso desta técnica de sexagem é o fato de ser minimamente invasiva quando comparado, por exemplo, a outras técnicas de sexagem, tais como, laparoscopia (FALAHATKAR et al., 2011) e biopsia (FALAHATKAR et al., 2013).

O princípio desta técnica de sexagem baseia-se na mensuração dos níveis plasmáticos dos hormônios 11-KT, T e E_2 por meio, principalmente, de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (CHU-KOO et al., 2009) e radioensaio (KOHN et al., 2013). O uso deste método é possível haja vista

as variações nos níveis plasmáticos dos esteroides sexuais de acordo com o sexo, o que proporciona oportunidade para a diferenciação entre machos e fêmeas (NAZERI et al., 2014; VIAYEH et al., 2006). Em geral, preconiza-se que os andrógenos (11-KT e T) e estrógenos (E_2) sejam determinantes do desenvolvimento gonadal em machos e fêmeas, respectivamente (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

De acordo com os resultados disponíveis na literatura, duas variáveis são imprescindíveis e determinantes para o uso desta abordagem como método de sexagem. Primeiramente, deve-se considerar se o parâmetro para sexagem se baseará nos valores dos hormônios individualmente (11-KT, T ou E_2) ou na relação entre o andrógeno e o estrógeno (11-KT/ E_2 ou T/ E_2) (CEAPA et al., 2002; NAZERI et al., 2014). Em segundo lugar, deve-se levar em conta o estágio de desenvolvimento gonadal dos animais

Em relação ao parâmetro para sexagem, os resultados obtidos até o momento indicam que ambas as técnicas utilizadas, determinação dos esteroides sexuais individualmente (VIAYEH et al., 2006) ou a relação entre eles (KOHN et al., 2013; NAZERI et al., 2014), apresentam-se como métodos viáveis para a identificação do sexo em peixes. Entretanto, tem-se sugerido a utilização da relação entre os esteroides (11-KT/ E_2 ou T/ E_2) como método mais eficaz (CEAPA et al., 2002; NAZERI et al., 2014). Isso se deve ao fato de que, embora os esteroides sexuais apresentem perfil de secreção diferente em função do sexo, níveis de andrógenos e estrógenos podem ser detectáveis tanto em macho como em fêmeas. Assim, torna-se mais preciso o uso da razão entre eles para a discriminação entre machos e fêmeas (CEAPA et al., 2002).

Considerando o estado de desenvolvimento gonadal, os resultados dependem das particularidades de cada espécie. Isso se deve ao fato de que o perfil de esteroides sexuais durante o curso da maturação sexual varia consideravelmente entre as diferentes espécies. Por exemplo, há espécies de

peixes em que os níveis de esteroides sexuais já são detectáveis no início da fase de desenvolvimento, como observado em esturjão branco (*Acipenser transmontanus*). Nesta espécie, foi possível identificar o sexo por dosagem de esteroides sexuais em animais jovens, sexualmente subdesenvolvidos (FEIST et al., 2004). Em contrapartida, em outras espécies, como por exemplo, cherne azul (*Polyprion oxygeneios*), a identificação do sexo por dosagem de esteroides sexuais só foi possível em animais maduros e em fase reprodutiva (KOHN et al., 2013). Em função dessas variações, a eficácia da sexagem pode ser diretamente dependente do estágio de desenvolvimento gonadal que o animal se encontra.

As vantagens do uso dos esteroides sexuais como método de sexagem concentra-se, principalmente, na grande precisão e eficácia da técnica, facilidade na realização das análises e o fato de ser minimamente invasiva como já exposto anteriormente. Entretanto, suas limitações devem ser sempre consideradas. A maior limitação refere-se ao custo elevado para realização das análises, uma vez que, a dosagem dos hormônios baseia-se em técnicas de ELISA e RIA, que são relativamente onerosas (POTTINGER et al., 2005).

Embora haja limitação, do ponto de vista de ganho produtivo, o alto valor dos testes pode ser compensado. Como consequência de uma identificação adequada do sexo, a reprodução em cativeiro poderá ser intensificada, aumentando assim, a produção de alevinos (FEIST et al., 2004). Sendo assim, a dosagem de esteroides é um abordagem a ser considerada como método de sexagem em diferentes espécies de peixes, especialmente naquelas em que a ausência de dimorfismo sexual limita a diferenciação entre os sexos.

2.4 Determinação sexual em peixes

A determinação do sexo, conceitualmente, é definida como os fatores que conduzem a uma gônada bipotencial a se desenvolver em testículos ou ovários (BARSKE; CAPEL, 2008). Em vertebrados, grande variedade de

mecanismos está envolvida na determinação do sexo, podendo ser, de uma maneira geral, mecanismos ambientais, genéticos ou associados aos cromossomos. Em suma, pelo menos um destes três eventos deve estar presente (MANOLAKOU; LAVRANOS; ANGELOPOULOU, 2006).

Considerando os fatores ambientais, estes estão presentes, principalmente, em répteis e peixes e incluem o efeito da temperatura, pH e fatores sociais. Em contrapartida, a determinação sexual mediada por fatores genéticos refere-se ao mecanismo em que pelo menos um gene específico é considerado o regulador central de uma cascata de evento que resulta na determinação do fenótipo sexual (SANDRA; NORMA, 2010). Por fim, pode ser regulado pela presença de cromossomos sexuais heteromórficos, na qual um gene ligado a um dos cromossomos sexuais regula os mecanismos de determinação sexual (MANOLAKOU; LAVRANOS, ANGELOPOULOU; 2006; SCHARTL, 2004).

Os peixes, comparados a todas as classes de vertebrados, possuem a maior diversidade e plasticidade de mecanismos de determinação do sexo. Não é difícil compreender a complexidade deste mecanismo em peixes visto a grande diversidade de espécies de peixes, o que reflete na biologia e ecologia dos animais. Como consequência desta diversidade, torna-se inconsistente explicar os mecanismos de determinação e diferenciação do sexo por uma única via (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Esta grande diversidade de sistemas de determinação do sexo em peixes pode ser atribuída aos eventos de duplicação genômica do ancestral deste grupo de vertebrado. Como consequência destas duplicações, observa-se redundância para o genoma, o que pode contribuir para a evolução de novos genes e vias metabólicas (MANK; PROMISLOW; AVISE, 2006).

Em peixes, embora os estudos ainda se limitem a poucos organismos, a literatura apresenta uma base sólida para a compreensão dos eventos

relacionados à determinação e diferenciação sexual. De uma maneira geral, tais mecanismos podem ser agrupados em duas categorias: determinantes genéticos e determinantes ambientais (SANDRA; NORMA, 2010). Anteriormente, acreditava-se que estes mecanismos eram independentes, no entanto, hoje já se sabe que ambos os determinantes, genéticos e ambientais, podem coexistir em uma mesma espécie (BARSKE; CAPEL, 2008).

2.4.1 Determinação sexual genética

A determinação sexual genética envolve uma série de complexas interações bioquímicas que resultam na determinação e diferenciação sexual. Em todos os vertebrados, o sistema genético pode envolver mecanismos de controle por cromossomos sexuais (sistema monogenético) ou por sistemas poligênicos, que envolve a presença de genes autossômicos (BULL, 1985). Em peixes, ambos os sistemas estão presentes. Independente do mecanismo envolvido, em sistemas genéticos certos componentes podem se tornar dominantes na determinação do sexo, de modo que os fatores ambientais exercem pouca influência. Neste sistema, determinados genes direcionarão a diferenciação para testículo, enquanto outros, para o desenvolvimento dos ovários (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

O sistema monogenético de determinação do sexo inclui os cromossomos sexuais XY e ZW e suas variantes, como por exemplo, sistema XO e ZO (SANDRA; NORMA, 2010). Em peixes, o número de espécies que apresentam cromossomos sexuais heteromórfico é extremamente baixo, sendo observado em uma frequência de, aproximadamente, 10% (ARKHIPCHUK, 1995). Embora possam estar presentes em algumas espécies, este é apenas mais um mecanismo de determinação do sexo em peixes e, muitas vezes, os trabalhos disponíveis na literatura não demonstram evidências claras de sua participação

na determinação do sexo (MANOLAKOU; LAVRANOS; ANGELOPOULOU, 2006; SANDRA; NORMA, 2010).

Diante do exposto acima, as novas perspectivas têm direcionado os estudos para compreender os sistemas alternativos de determinação do sexo, uma vez que, presume-se pouca participação dos cromossomos sexuais na determinação sexual em peixes. De fato, em peixes os fatores determinantes do sexo localizados nos cromossomos sexuais não são fortes o suficiente quando comparados aos fatores sexuais nos cromossomos autossômicos (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; KOMEN; YAMASHITA; NAGAHAMA, 1992).

Em sistemas monogênicos, o sexo é determinado por um gene localizado em um dos cromossomos sexuais e o estado genético de qualquer outro cromossomo no genoma tem pouco efeito sobre o resultado de determinação do sexo (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Em peixes, o envolvimento dos cromossomos sexuais na determinação sexual é classicamente observado em duas espécies: medaka (*Oryzias latipes*) e peixe-rei (*Odontesthes hatcheri*). Em medaka, os machos são heterogaméticos (XY), sendo que no cromossomo Y está presente o gene *Dmy* (*Dmrt*), estando este, comprovadamente, envolvido na determinação do sexo, resultando no desenvolvimento dos testículos (MATSUDA et al., 2007). De maneira semelhante, em peixe-rei, onde os machos também são heterogaméticos, o gene *Amy*, presente no cromossomo Y, regula a diferenciação sexual. Na sua ausência, ocorre a expressão dos genes *Foxl2* e citocromo P450 19A1a (*Cyp19a1*), ambos responsáveis pela determinação e diferenciação do ovário (HATTORI et al., 2012).

Outras espécies de peixes também apresentam cromossomos sexuais, embora não se saiba exatamente sua participação na determinação sexual. Como exemplo, pode-se citar as espécies onde os machos são heterogaméticos, tais como, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (THORGAARD, 1997) e tilápia do

Nilo (*Oreochromis niloticus*) (BAROILLER; GUIGUEN; FOSTIER, 1999), e também espécies em que as fêmeas são heterogaméticas, tais como, tilápia áurea (*Oreochromis aureus*) (MAIR et al., 1991), *Xiphophorus* e *Gambusia* (VOLFF; SCHARTL, 2001). Além destes, em salmão (*Salmo salar*), tem-se sugerido a presença de um *locus* determinante do sexo no cromossomo 2, sendo este referido, possivelmente, como cromossomo sexual (ARTIERI et al., 2006). Esta plasticidade dos cromossomos sexuais indica que, em muitas espécies de peixes, os genes determinantes do sexo localizados nos cromossomos sexuais sejam diferentes, embora possam operar por vias de controle comuns (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Em sistemas poligenéticos, o *locus* determinante do sexo pode estar localizado em diferentes cromossomos, podendo segregar-se aleatoriamente e fornecer fortes influências sobre a determinação do sexo. Nestes casos, o sexo é determinado pela ação genética acumulativa de todos os fatores envolvidos na sua determinação (BULL, 1985). Este sistema tem sido proposto por evoluir a partir de sistemas com evidências claras de cromossomos sexuais (OTA et al., 2000), o que sugere que o número e o tipo de *locus* envolvidos na determinação do sexo em peixes possam ser extremamente plásticos (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Além dos cromossomos sexuais, diversos estudos têm relatado a participação de vários genes autossômicos na determinação sexual em diversos vertebrados, sendo o mesmo válido para peixes. Geralmente, os mecanismos moleculares e funcionais associados a este tipo de sistema de determinação do sexo são altamente conservados entre as espécies e, devido a isso, possibilitam a identificação de genes candidatos (GRAVES; PEICHEL, 2010; IJIRI et al., 2008; SANDRA; NORMA, 2010). Como exemplo, pode-se destacar a participação dos genes *Sox9*, *Sox3*, *Foxl2*, *Dmrt1*, *Amh*, *Wt1*, *Wnt4*, *Fgf9*, *Cyp19*,

entre outros (SANDRA; NORMA, 2010), como será discutido com mais detalhes adiante.

As espécies de peixes que apresentam influência autossômica na determinação do sexo, muitas vezes, não possuem cromossomos sexuais citologicamente distintos, uma vez que, não retêm dominância significativa durante a determinação do sexo (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Por outro lado, em algumas espécies com sistemas de determinação sexual genética, com cromossomos XY ou ZW, pode-se observar forte influência dos fatores localizados em cromossomos autossômicos, como observado, por exemplo, em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SCOTT et al., 1989) e carpa comum (*Cyprinus carpio*) (KOMEN; YAMASHITA; NAGAHAMA; 1992). Em zebrafish (*Danio rerio*), a determinação do sexo é considerada um evento poligenético, associado, especialmente, a dois genes, *Vasa* e *FtzF1*, entretanto, não está diretamente relacionado aos cromossomos sexuais (VON HOFSTEN; OLSSON, 2005). De maneira semelhante, em robalo (*Dicentrarchus labrax*), foi proposta uma hipótese poligenética para a determinação do sexo (VANDEPUTTE et al., 2007).

2.4.2 Determinação sexual ambiental

A influência de fatores ambientais na determinação do sexo é particularmente importante em peixes. Em diferentes espécies, a determinação do sexo pode ocorrer tardiamente até a maturação sexual, o que permite que fatores externos influenciem o sexo. Assim, o indivíduo pode adotar o sexo que lhe confere maior sucesso reprodutivo, de acordo com o contexto ambiental no qual está inserido (MANK; AVISE, 2009). Entre os principais determinantes ambientais que podem influenciar a proporção do sexo destacam-se: temperatura, pH, densidade populacional e interações sociais (NAKAMURA et al., 1998).

Entre os fatores supracitados, a temperatura representa, sem menor objeção, o principal fator ambiental determinante do sexo em peixes. Sendo assim, como na maior parte das vezes, a determinação ambiental está associada à temperatura; este processo é comumente descrito como determinação sexual termodependente (MANOLAKOU; LAVRANOS; ANGELOPOULOU, 2006). O efeito da temperatura é visto especialmente nos primeiros estágios de desenvolvimento, sendo seu efeito capaz de alterar as vias bioquímicas da determinação sexual (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; SANDRA; NORMA, 2010) e, conseqüentemente, o desenvolvimento masculino ou feminino (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Como exemplo de espécies termossensíveis, pode-se citar diferentes espécies do gênero *Apistograma* (OSPINA-ALVAREZ; PIFERRER, 2008); robalo (*Dicentrarchus labrax*) (PAVLIDIS et al., 2000), *Menidia menidia* (CONOVER; KYNARD, 1981), peixe-rei (*Odonthestes bonariensis*) (STRUSSMAM et al., 1996), tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) (WANG; TSAI, 2000), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (BAROILER; GUIGUEN; FOSTIER, 1999), entre outras. Nestas espécies, de uma maneira geral, observa-se um aumento na proporção de machos quando a temperatura aumenta, em contrapartida, o aumento da proporção de fêmeas ocorre em baixas temperaturas (BAROILLER; GUIGUEN; FOSTIER, 1999).

Embora não se conheça exatamente os mecanismos pelos quais a temperatura influencia a proporção entre os sexos, possíveis efeitos têm sido associados à sua influência sobre a atividade da aromatase e esteroides sexuais (CREWS, 1996). Por exemplo, em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi observado que em temperaturas elevadas os níveis de RNAm para aromatase e os níveis de estradiol são reduzidos, o que resulta em masculinização (D’COTTA et al., 2001; KITANO et al., 1999).

Além da temperatura, outros fatores ambientais devem ser levados em consideração. Por exemplo, embora exerça menor influência, o pH influenciou a proporção sexual em diferentes espécies dos gêneros *Apistograma*, *Pelvichacromis* e *Poeciliidae* (BARON et al., 2004). Em geral, em condições de pH elevado, a proporção de machos é reduzida (ROEMER; BEISENHERZ, 1996). Não menos importante, os fatores sociais têm também sido relatados como determinantes do sexo, entretanto, os mecanismos específicos que controlam tal influência são ainda obscuros (GODWIN, 2009). Os principais fatores sociais incluem: densidade populacional, tamanho relativo, proporção entre os sexos e estimulação por ferormônios (SANDRA; NORMA, 2010).

Independente do sistema de determinação sexual em peixes, este é um evento que ocorre, principalmente, durante o desenvolvimento precoce, definindo assim, o curso do desenvolvimento gonadal e manutenção subsequente do estado de diferenciação. Este mecanismo é controlado através da estabilidade de padrões de expressão gênica e mecanismos de *feedback* que asseguram um perfil consistente de sinais celulares e hormonais que irão culminar com a diferenciação sexual (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

2.4.3 Diferenciação sexual em peixes

Embora conceitualmente diferentes, muitas vezes, a distinção entre os termos determinação e diferenciação sexual é difícil. Segundo proposto por Devlin e Nagahama (2002), a determinação sexual refere-se aos processos e variáveis genéticas e ambientais que influenciam a diferenciação sexual, sendo responsável pelo estabelecimento do sexo genotípico. Em contrapartida, a diferenciação sexual faz referência aos mecanismos físicos destes eventos em termos de desenvolvimento testicular ou ovariano (sexo gonadal ou fenotípico). Tais eventos de diferenciação só ocorrem após o sexo genotípico ter sido estabelecido (SANDRA; NORMA, 2010).

Em peixes, a diferenciação sexual, assim como observado para os mecanismos de determinação do sexo, é extremamente variável entre as diferentes espécies de peixes, sendo extremamente plástico. Assim, os eventos moleculares e celulares envolvidos neste processo podem variar consideravelmente dependendo da espécie, com particularidades específicas em cada uma delas (SANDRA; NORMA, 2010). Entretanto, basicamente, dois padrões de diferenciação são observados, envolvendo as espécies gonocóricas e espécies hermafroditas (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

A maioria das espécies de peixes é gonocórica, ou seja, os indivíduos se desenvolvem em machos ou fêmeas e permanecem assim por toda a sua vida (YAMAMOTO, 1969). No entanto, a via inicial de desenvolvimento gonadal nestas espécies pode ser de dois tipos: diferenciação direta, quando a partir de uma gônada indiferenciada forma-se o ovário ou testículo; e diferenciação indireta, em que, inicialmente, em todos os indivíduos ocorre primeiro a formação do ovário e, posteriormente, em metade dos indivíduos, os ovários se diferenciam em testículos (YAMAMOTO, 1969). Em contrapartida, as espécies hermafroditas, ocorrendo de forma natural em peixes, são aquelas em que ambos os tecidos gonadais, testículo e ovário, estão presentes em um mesmo indivíduo (SHAPIRO, 1990).

Independente do padrão de diferenciação sexual, após a seleção de um determinado perfil de desenvolvimento gonadal, este se torna um processo estável ao longo do desenvolvimento subsequente (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Inicialmente, assim como observado em outros vertebrados, a gônada indiferenciada, composta essencialmente por células germinativas primordiais (PGC) e células somáticas, durante a ontogênese se diferencia em ovário ou testículo (SANDRA; NORMA, 2010). Durante a diferenciação sexual, ambas as células germinativas e somáticas são importantes para os eventos que

coordenam este processo, atuando por meio de interações entre elas (NAKAMURA et al., 1998).

A diferenciação ovariana, em determinadas espécies de peixes, tais como, tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), inicia-se pelo aparecimento de um espaço estreito no tecido estromal, o que representa a formação da cavidade ovariana (NAKAMURA; NAGAHAMA, 1989). Por outro lado, em outras espécies, como por exemplo, em medaka (*Oryzias latipes*) e truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), a diferenciação inicia-se a partir da meiose das células germinativas durante a ovogênese, subsequentemente ao aumento das células germinativas primordiais (LEBRUN; BILLARD; JALABERT, 1982). No decorrer da diferenciação ovariana, as células germinativas se diferenciam para formar os folículos ovarianos, que são compostos pelo ovócito e pela camada de células da granulosa, cercadas por uma camada de células da teca (GRIER, 2000).

Em relação à diferenciação testicular, os testículos permanecem indiferenciados por mais tempo que os ovários, sendo sua diferenciação somática posterior ao aparecimento das células germinativas (PATIÑO; TAKASHIMA, 2005). Nas gônadas destinadas a se diferenciarem em testículos, as células germinativas permanecem quiescente por um longo período, diferente ao observado para as fêmeas (NAKAMURA et al., 1998). Os critérios que marcam o início da diferenciação testicular variam entre as diferentes espécies de peixes. Por exemplo, em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), a diferenciação testicular inicia-se a partir do aparecimento de espaços no estroma gonadal, as quais, subsequentemente, dão origem ao ducto deferente. Nestas espécies, a espermatogênese só se inicia em torno de 50-70 dias após a eclosão (NAKAMURA; NAGAHAMA, 1989). Em guppy (*Poecilia reticulata*), a

formação dos ductos espermáticos e tecido intersticial marcam o início da diferenciação, caracterizada por agregação de células estromais (TAKAHASHI, 1974).

Os esteroides sexuais são considerados os principais mediadores da diferenciação sexual em vertebrados não mamíferos, incluindo os peixes, embora não atuem de forma primária neste processo. Assim, na maioria das espécies, o E₂ é o principal hormônio associado à diferenciação sexual, uma vez que, na sua presença ocorre a formação dos ovários nas fêmeas. Em contrapartida, os andrógenos são uma consequência da diferenciação dos testículos, embora, em algumas espécies, a síntese de T e 11-KT possam ocorrer antes ou durante o processo crítico de diferenciação sexual (MIURA et al., 2002). Como consequência de uma série de eventos bioquímicos e moleculares, a diferenciação sexual das fêmeas, geralmente, precede a dos machos (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002) e envolve a expressão de uma série de enzimas esteroidogênicas (P450scc, 3β-HSD, P450c17 e P450arom) (NAKAMURA et al., 1998). Tais enzimas não são detectáveis no testículo durante a diferenciação sexual, sendo os andrógenos endógenos envolvidos nesta diferenciação (NAKAMURA et al., 1998).

2.4.4 Bases moleculares da determinação e diferenciação sexual em peixes

Em peixes, independente se o sexo é determinado ou não por mecanismos genéticos, os genes expressos nas gônadas associados a estes eventos são relativamente conservados entre os vertebrados e são críticos para a formação dos ovários ou testículos. Assim, várias famílias de genes têm sido relatadas por participar dos processos de determinação e diferenciação sexual e, como mencionado anteriormente, segue vias conservadas entre os demais vertebrados (SANDRA; NORMA, 2010). Na presente revisão, serão considerados três importantes genes, sendo estes, *Foxl2*, *Sox1* e *Wt1*

2.4.4.1 *Foxl2*

O gene *Foxl2* foi identificado pela primeira vez em 1998 em humanos, como sendo um novo membro da família dos fatores de transcrição *forkhead* (família FOX), que se caracteriza pela presença do domínio conservado *forkhead box* de ligação ao DNA (CRISPONI et al., 2001). A sequência de aminoácidos deste domínio é altamente conservada ente as diferentes espécies de vertebrados sugerindo a função conservada desta região durante a evolução (COCQUET et al., 2002). Outra importante característica deste fator de transcrição é a presença de uma sequência de poliamina de 14 resíduos, extremamente conservado em mamíferos eutérios (COCQUET et al., 2002).

Em mamíferos, *Foxl2* é um fator de transcrição essencial na determinação e diferenciação do sexo ovariano, além de desempenhar papel importante no desenvolvimento e manutenção do folículo ovariano (CABURET et al., 2012). *Foxl2* é tipicamente expresso no ovário, sendo primeiramente detectável no momento da determinação sexual e, posteriormente, mantido ao longo da vida fetal e também na vida adulta. Sua expressão é restrita ao compartimento somático do ovário, especificamente nas células da granulosa (COCQUET et al., 2002).

Em peixes, têm sido identificados dois genes paralogos de *Foxl2*, sendo estes denominados *Foxl2a* e *Foxl2b* (JIANG et al., 2011). Como exemplo de espécies em que foram caracterizados ambos os genes pode-se destacar, *Dicentrarchus labrax* (CRESPO et al., 2013) e *Oncorhynchus mykiss* (BARON et al., 2004). Ambos os genes são conhecidos por codificar fatores de transcrição funcionais que podem reconhecer sítios de ligação de DNA semelhantes (CRESPO et al., 2013). Entretanto, as funções de *Foxl2a* são mais conhecidas por participar, diretamente ou indiretamente, da função ovariana. Por outro lado, *Foxl2b* tem sido sugerido por participar da regulação de genes específicos do desenvolvimento testicular (BARON et al., 2004).

Em peixes, semelhante ao que ocorre em mamíferos, padrão de expressão sexualmente dimórfico também está presente, sendo *Foxl2* preferencialmente expressos no ovário. Tal padrão de expressão foi evidenciado em diferentes espécies, incluindo, robalo (*Dicentrarchus labrax*) (CRESPO et al., 2013), bagre andador (*Clarias batrachus*) (BHATDAR et al., 2016), rare minnow (*Gobiocypris rarus*) (JIANG et al., 2011), linguado (*Paralichthys olivaceus*) (SI et al., 2016), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (WANG et al., 2004), medaka (*Oryzias latipes*) (NAKAMOTO et al., 2006) e peixe-carvão (*Anoplopoma fimbria*) (SMITH; GUZMÁN; LUCKENBACH, 2013). Quanto ao local de expressão, *Foxl2* tem sido originalmente expresso em células da granulosa ao longo do desenvolvimento ovariano (NAKAMOTO et al., 2006). Portanto, como em outros grupos de vertebrados, *Foxl2* desempenha importante papel na diferenciação ovariana (LIU et al., 2015).

Entre as funções desempenhadas pelo *Foxl2* na diferenciação e determinação sexual em peixes, a mais conhecida delas é a regulação da expressão de *Cyp19a1*, que codifica a aromatoase P450, sendo observado em diferentes espécies, tais como robalo (*Dicentrarchus labrax*) (CRESPO et al., 2013), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (WANG et al., 2004), linguado *Paralichthys olivaceus* (SI et al., 2016) e scatophagus verde (*Scatophagus argus*) (LIU et al., 2015). Como exemplo desta regulação, em robalo (*Dicentrarchus labrax*), a transfecção de transgênicos *Foxl2* em células foliculares resultou em aumento significativo na expressão de *Cyp19a1* e, simultaneamente, na expressão da proteína StAR (CRESPO et al., 2013). A proteína StAR e a aromatase P450 estão envolvidas no transporte de colesterol para a membrana interna da mitocôndria e na conversão de andrógenos em estrógenos, respectivamente.

Assim, segundo Crespo et al. (2013), *Foxl2* atua na esteroidogênese através de dois mecanismos reguladores principais. Primeiramente, *Foxl2*

mantém nível elevado de estradiol durante a vitelogênese, por meio da transativação de *Cyp19a1*. Em segundo lugar, permite a manutenção de altos níveis de colesterol necessária para a esteroidogênese, por meio da regulação positiva da proteína StAR. De maneira semelhante, em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a regulação da aromatase pode ocorrer diretamente pela ligação em *Cyp19a1*, ou indiretamente pela interação com *Sf-1*, aumentando a sua transcrição e, conseqüentemente, a produção de estrógeno na gônada feminina (WANG et al., 2004). Complementando estes resultados, a expressão elevada de *Foxl2* nos tecidos que envolvem o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, também indica a participação deste fator de transcrição na biossíntese dos esteroides sexuais (ELLSWORTH et al., 2003). A síntese endógena de hormônios sexuais pelas gônadas é crítica para a diferenciação e desenvolvimento gonadal em peixes, indicando, mais uma vez, a importância deste fator de transcrição na regulação dos eventos associados à determinação e diferenciação sexual (LIU; ZHANG; WANG, 2010).

Além de atuar diretamente na diferenciação ovariana, *Foxl2* também atua reprimindo a diferenciação testicular, principalmente, pela inibição do gene *Sox9*, que desempenha papel importante na determinação do sexo masculino (CABURET et al., 2012). Adicionalmente, outras importantes funções do fator de transcrição *Foxl2* no ovário incluem: regulação dos mecanismos de apoptose, desintoxicação de espécies reativas de oxigênio, controle da proliferação celular, preservação da identidade das células da granulosa e de sua diferenciação em células de Sertoli. Assim, todas estas funções indicam o papel central de *Foxl2* no desenvolvimento e manutenção do ovário, até mesmo em adultos (CABURET et al., 2012).

2.4.4.2 *Sox9*

O gene *Sox9* faz parte do grupo E da família de genes SOX caracterizado pela presença do domínio de ligação ao DNA HMG-box (SINCLAIR et al., 1990). Este gene codifica um importante fator de transcrição *Sox9*, sendo considerado um dos principais fatores relacionados à diferenciação gonadal em vertebrados (KENT et al., 1996). Em mamíferos, *Sox9* é expresso na gônada, sendo crítico no processo de diferenciação testicular (VIDAL et al., 2001). Em vertebrados não mamíferos, como aves, répteis e peixes, também tem sido relatada a participação de *Sox9* na diferenciação gonadal, no entanto, os padrões de expressão diferem entre as diferentes espécies, sugerindo plasticidade funcional em vertebrados (SANDRA; NORMA, 2010).

Quanto à caracterização do gene *Sox9* em peixes, os resultados disponíveis na literatura indicam que, para diferentes espécies, têm sido identificados diferentes tipos de genes *Sox9*, sendo estes denominados de maneiras diferentes. Por exemplo, em zebrafish (*Danio rerio*), bagre andador (*Clarias batrachus*), bagre africano (*Clarias gariepinus*), dois diferentes genes *Sox9* foram identificados, sendo estes denominados *Sox9a* (predominantemente expresso no testículo) e *Sox9b* (predominantemente expresso no ovário), ambos ortólogos ao gene *Sox9* de tetrápodes (BHAT et al., 2016a; BHAT et al., 2016b; RAGHUVVEER; SENTHILKUMARAN, 2011; RODRÍGUEZ-MARÍ et al., 2005). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), também foram identificados dois genes, sendo estes, *Sox9a1* (predominantemente expresso no testículo) e *Sox9a2* (VIZZIANO et al., 2007).

Em contrapartida, em medaka (*Oryzias latipes*), inicialmente, havia sido identificado apenas um gene *Sox9*, sendo este expresso apenas no ovário, indicando que *Sox9* estava presente como uma cópia única no genoma (YOKOI et al., 2002). Posteriormente, identificou-se um tipo de *Sox9* predominante expresso no testículo de animais adultos, sendo este denominado *Sox9a2*

(NAKAMOTO et al., 2005), com padrão de expressão semelhante ao observado em zebrafish (*Danio rerio*) (CHIANG et al., 2001). E ainda, em outras espécies, tais como, tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (IRIJI et al., 2008) e garoupa alaranjada (*Epinephelus coioides*) (LUO et al., 2010), apenas um gene *Sox9* tem sido identificado. Assim, de acordo com o exposto, independente de denominações, pode-se convencionar-se que, pelo menos um dos genes *Sox9*, esteja envolvido nas funções testiculares em peixes.

Em peixes, a participação do fator de transcrição *Sox9* nos processos de determinação e diferenciação sexual não é tão clara como observado em mamíferos. Isto se deve ao fato de que, dependendo da espécie, o perfil de expressão gênica pode variar consideravelmente e, conseqüentemente, pode afetar a função exercida por ele. Por exemplo, em medaka (*Oryzias latipes*), a presença de *Sox9a2* em células germinativas primordiais de ambos os sexos, sendo sua expressão detectada durante todo o processo de diferenciação sexual, indica que, para esta espécie, *Sox9a2* não exerça papel fundamental no processo de determinação e diferenciação sexual (NAKAMOTO et al., 2005). De encontro a este resultado, em peixe-carvão *Anoplopoma fimbria* e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a diferenciação gonadal, perfil de expressão semelhante para *Sox9* foi observado no ovário e testículos, indicando que, para estas espécies, *Sox9* também não seja crítico para a diferenciação gonadal (IRIJI et al., 2008; LUO et al., 2010).

Em contrapartida, em zebrafish (*Danio rerio*), a expressão predominante de *Sox9a* e *Sox9b* no testículo e ovário, respectivamente, ao longo da diferenciação gonadal, indica que, para esta espécie, *Sox9a* e *Sox9b* sejam fundamentais para a diferenciação testicular e ovariana, respectivamente (RODRÍGUEZ-MARÍ et al., 2005). Seguindo este mesmo padrão de expressão, em bagre andador (*Clarias batrachus*) e bagre africano (*Clarias gariepinus*) *Sox9* também exerce importante papel na diferenciação e desenvolvimento

ovariano (BHAT et al., 2016a; RAGHUVVEER; SENTHILKUMARA, 2010). De maneira semelhante, em garoupa alaranjada (*Epinephulus coioides*), *Sox9* foi relatado por estar envolvido, possivelmente, em diferentes vias de sinalização subjacentes à determinação e diferenciação sexual (LUO et al., 2010).

Considerando a função exercida pelo *Sox9* na diferenciação testicular em peixes, tem sido preconizada sua regulação positiva sobre o gene *Amh* (RODRÍGUEZ-MARÍ et al., 2005), o que está de acordo ao observado em mamíferos. *Amh* é expresso em células de Sertoli em testículos fetais, sendo sua função principal regular a regressão dos ductos de Muller, que é responsável pela diferenciação das tubas uterinas e útero em fêmeas. Sendo assim, *Sox9* estaria envolvido na diferenciação sexual por intermédio da ativação do gene *Amh*. Além da participação na determinação e diferenciação sexual em algumas espécies de peixes (BHAT et al., 2016a; LUO et al., 2010; RODRÍGUEZ-MARÍ et al., 2005), *Sox9* também exerce outras importantes funções testiculares, que incluem: desenvolvimento de estruturas tubulares no testículo, após a diferenciação gonadal (NAKAMOTO et al., 2005), proliferação de células germinativas primordiais em testículo e ovário (IRIJI et al., 2008), diferenciação e manutenção de células de Sertoli (LUO et al., 2010).

2.4.4.3 *Wt1*

O gene supressor do tumor de Wilm's (*Wt1*) codifica um importante fator de transcrição que exerce funções essenciais no desenvolvimento urogenital, principalmente dos testículos e rins. Em seres humanos, por exemplo, mutações em *Wt1* resultam em anomalias no desenvolvimento dos rins e das gônadas, indicando sua importância fundamental no desenvolvimento coordenado de ambos os órgãos (KLÜVER et al., 2009).

Em peixes, dois diferentes genes *Wt1* têm sido identificados, sendo estes denominados, *Wt1a* e *Wt1b*, o que foi observado para diferentes espécies, tais

como carpa comum (*Cyprinus carpio*) (CHEN et al., 2015), medaka (*Oryzias latipes*) (KLÜVER et al., 2009) e zebrafish (*Danio rerio*) (BOLLIG et al., 2006). Assim como observado em mamíferos, existem evidências na literatura de que *Wt1* também seja importante para a diferenciação gonadal em peixes. Por exemplo, em medaka (*Oryzias latipes*), *Wt1* foi expresso em células somáticas dos primórdios gonadais, participando diretamente do processo de desenvolvimento gonadal (KLÜVER et al., 2009). Outra evidência é o padrão de expressão diferencial, em função do sexo, para este gene em determinadas espécies. Por exemplo, em bagre andador (*Clarias batrachus*), maior expressão de *Wt1* foi detectado no testículo em desenvolvimento, quando comparado ao ovário (MURUGANANTHKUMAR; SENTHILKUMARAN, 2016). De maneira semelhante, em carpa comum (*Cyprinus carpio*), maior expressão de *Wt1* também foi detectada no testículo, sendo possivelmente associada à diferenciação testicular (CHEN et al., 2015).

Em relação às funções de *Wt1* em peixes, pode-se destacar a sua participação na regulação transcricional de genes envolvidos na diferenciação gonadal. Por exemplo, em bagre andador (*Clarias batrachus*), o silenciamento transitório de *Wt1*, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, resultou na diminuição da expressão *Sf1* e *Gata 4* (MURUGANANTHKUMAR; SENTHILKUMARAN, 2016) sendo ambos os genes conhecidos por sua participação na determinação e diferenciação testicular (CHEN et al., 2015). Além disso, *Wt1* é também um importante regulador da esteroidogênese (CHEN et al., 2014), sendo evidenciado, por exemplo, pela redução de diferentes enzimas esteroidogênicas *1* (MURUGANANTHKUMAR; SENTHILKUMARAN, 2016), incluindo a regulação do gene *Cyp19a1*, que codifica a aromatase P450.

Além da regulação transcricional, *Wt1* participa também de outras importantes funções em peixes teleóteos. Por exemplo, a presença de *Wt1*

durante o desenvolvimento gonadal precoce é necessária para a manutenção das células germinativas primordiais (KLÜVER et al., 2009). Em contrapartida, em animais adultos, a expressão de *Wtl* tem sido detectada em espermatogônias e espermatócitos, indicando sua participação na espermatogênese (MURUGANANTHKUMAR; SENTHILKUMARAN, 2016). Além disso, a expressão de *Wtl* em células de Sertoli de animais adultos indica sua participação na manutenção da gônada após a diferenciação e desenvolvimento terem sido finalizados (KLÜVER et al., 2009).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação do sexo em *A. ocellatus* é de grande relevância para a reprodução em cativeiro, uma vez que, pode contribuir para o estabelecimento do plantel de reprodutores considerando a proporção adequada entre os sexos. Entretanto, embora seja importante, a diferenciação entre machos e fêmeas é limitada, haja vista a ausência de dimorfismo sexual na espécie. Assim sendo, o desenvolvimento de estudos que possibilite a definição de metodologias para sexagem em *A. ocellatus* faz-se necessária.

Considerando a problemática abordada acima, aliada à importância da espécie no comércio nacional e a pouca informação sobre *A. ocellatus*, o presente estudo atua de modo a colaborar com o desenvolvimento de diferentes métodos de sexagem na espécie em questão. Além disso, fornece uma base científica do ponto de vista comportamental, hormonal e molecular no que diz respeito ao *A. ocellatus*. Com isso, os resultados deste estudo fornecerão novas perspectivas relacionadas à identificação do sexo em peixes, sendo úteis para novas pesquisas.

REFERÊNCIAS

ARAI, R.; TAJIMA, H.; TAMAOKI, N. I. In vitro transformation of steroids by the head kidney, the body kidney, and corpuscles of Stannius of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **General Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 12, n. 1, p. 99-109, Jan. 1969.

ARCHARD, G. A.; BRAITHWAITE, V. A. Variation in aggressive behaviour in the poeciliid fish *Brachyrhaphis episcopi*: Population and sex differences. **Behavioural Processes**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 52–57, Jan. 2011.

ARIYOMO, T. O.; WATT, P. J. Aggression and sex differences in lateralization in the zebra fish. **Animal Behaviour**, London, v. 86, n. 3, p. 617–622, Sept. 2013.

ARIYOMO, T. O.; WATT, P. J. The effect of variation in boldness and aggressiveness on the reproductive success of zebrafish, *Danio rerio*. **Animal Behaviour**, London, v. 83, n. 1, p. 41-46, Jan. 2012.

ARKHIPCHUK, V. V. Role of chromosomal and genome mutations in the evolution of bony fishes. **Hydrobiological Journal**, New York, v. 31, p. 55-65, 1995.

ARNOTT, G.; ELWOOD, R. W. Gender differences in aggressive behaviour in convict cichlids. **Animal Behaviour**, London, v. 78, n. 5, p. 1221–1227, Nov. 2009.

ARTIERI, C. G. et al. Identification of the sexdetermining locus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) on chromosome 2. **Cytogen Gen Research**, Basel, v. 112, n. 1-2, p. 152-159, 2006.

BAERENDS, G. P.; BAERENDS-VAN RON, J. **An introduction to the study of the ethology of cichlid fishes**. Leiden: Brill, 1992. 242 p.

BALSHINE-EARN, S.; McANDREW, B. J. Sex-role reversal in the black-chinned tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Ruppel) (Cichlidae). **Behaviour**, Leiden, v. 132, n. 11, p. 861–874, 1995.

BAROILLER, J. F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **CMLS: cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 55, n. 6, p. 910–931, June 1999.

BARON, D. et al. An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. **Journal Molecular Endocrinology**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 705–715, Dec. 2004.

BARSKE, L. A.; CAPEL, B. Blurring the edges in vertebrate sex determination. **Current Opinion in Genetics and Development**, Bristol, v. 18, n. 6, p. 499–505, 2008.

BEECHING, S. C. Functional groups in the social behavior of a cichlid fish, the Oscar, *Astronotus ocellatus*. **Behavioural Processes**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 85–93, Jan. 1997.

BHAT, I. A. et al. Expression analysis of Sox9 genes during annual reproductive cycles in gonads and after nanodelivery of LHRH in *Clarias batrachus*. **Research in Veterinary Science**, London, v. 106, p. 100–106, June 2016a.

_____. Molecular cloning, computational analysis and expression pattern of forkhead box 12 (Fox12) gene in catfish. **Computational Biology and Chemistry**, Oxford, v. 64, p. 9–18, Oct. 2016b.

BOBE, J. et al. Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays. **Reproduction Biology Endocrinology**, London, v. 4, p. 39, July 2006.

BOLLIG, F. et al. Identification and comparative expression analysis of a second wt1 gene in zebrafish. **Development Dynamics**, New York, v. 235, n. 2, p. 554–561, Feb. 2006.

BORG, B. Androgens in teleost fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: pharmacology, toxicology & endocrinology**, Oxford, v. 109, n. 3, p. 219–245, Nov. 1994.

BULL, J. J. Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. **Experientia**, Basel, v. 41, n. 10, p. 1285–1296, Oct. 1985.

CABURET, S. et al. The transcription factor FOXL2: at the crossroads of ovarian physiology and pathology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 356, n. 1–2, p. 55–64, June 2012.

CEAPA, C. et al. Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*acipenser stellatus* Pallas) during spawning migration in the Danube River.

Journal of Applied Ichthyology, Berlin, v. 18, n. 4–6, p. 391–396, Dec. 2002.

CHEN, J. J. et al. Identification and comparison of gonadal transcripts of testis and ovary of adult common carp *Cyprinus carpio* using suppression subtractive hybridization. **Theriogenology**, Los Altos, v. 83, n. 9, p. 1416–1427, June 2015.

CHEN, M. et al. Wt1 is involved in leydig cell steroid hormone biosynthesis by regulating paracrine factor expression in mice. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 90, n. 4, p. 71, Apr. 2014.

CHIANG, E. F. et al. Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. **Development Biology**, New York, v. 231, n. 1, p. 149–63, Mar. 2001.

CHU-KOO, F. et al. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 125–136, Mar. 2009.

CLELLAND, E.; PENG, C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 312, n. 1–2, p. 42–52, Nov. 2009.

COCQUET, J. et al. Evolution and expression of FOXL2. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 39, n. 12, p. 916–921, Dec. 2002.

CONOVER, D. O.; KYNARD, B. E. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. **Science**, New York, v. 213, n. 4507, p. 577–579, 1981.

CRESPO, B. et al. Foxl2 and foxl3 are two ancient paralogs that remain fully functional in teleosts. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 194, p. 81–93, Dec. 2013.

CREWS, D. Temperature-dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. **Zoological Science**, Tokyo, v. 13, n. 1, p. 1–13, Feb. 1996.

CRISPONI, L. et al. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis / ptosis / epicanthus inversus syndrome. **Nature Genetics**, New York, v. 27, n. 2, p. 159–166, Feb. 2001

DAVIS, J. M.; NUFIO, C. R.; PAPA, J. D. R. Resource quality or competition: why increase resource acceptance in the presence of conspecifics? **Behavioral Ecology**, New York, v. 22, n. 4, p. 730-737, July/Aug. 2011.

D’COTTA, H. et al. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 59, n. 3, p. 265-276, July 2001.

DESJARDINS, J. K.; FERNALD, R. D. What do fish make of mirror images? **Biology Letters**, London, v. 6, n. 6, p. 744-747, Dec. 2010.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish : an overview of genetic , physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 208, n. 3-4, p. 191–364, June 2002.

ELLSWORTH, B. S. et al. The gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor activating sequence (GRAS) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including Smads, AP-1 and a forkhead DNA binding protein. **Molecular Cell Endocrinology**, Amsterdam, v. 206, n. 1-2, p. 93–111, Aug. 2003.

ENQUIST, M.; JAKOBSSON, S. Assessment of lighting ability in the cichlid fish *Nannacara anomala*. **Ethology**, Berlin, v. 72, p. 143-153, 1986.

FALAHATKAR, B. et al. Laparoscopy , a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 321, n. 3-4, p. 273–279, Dec. 2011.

_____. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon, *Huso huso* L. through biopsy. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz, v. 14, n. 2, p. 133–139, 2013.

FEIST, G. et al. Early identification of sex in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, n. 1-4, p. 581–590, Apr. 2004.

FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. **Fish adaptations**. New York: Science Publishers, 2003. p. 285-308.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus cellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução. Hábitos de desova e prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484, 1982.

FRASNELLI, E.; VALLORTIGARA, G.; ROGERS, L. J. Left-right asymmetries of behaviour and nervous system in invertebrates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Fayetteville, v. 36, n. 4, p. 1273-1291, Apr. 2012.

FUJITA, T. et al. Quantification of serum levels of precursor to vitelline envelope proteins (choriogenins) and vitellogenin strogen-treated masu salmon *Oncorhynchus masou*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 136, n. 1, p. 49-57, Mar. 2004.

FURY, J. R.; MORELLO, F. A. The contribution of an exotic fish, the oscar, to the sport fishery of the Everglades water conservation areas. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOUTHEASTERN ASSOCIATION OF FISH AND WILDLIFE AGENCIES, 48., 1994, Biloxi. **Proceedings...** Biloxi: SEAFWA, 1994. p. 474-481.

GARCIA-LOPEZ, A. et al. Leydig cells express FSH receptors in African catfish. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 150, n. 1, p. 357-365, Jan. 2008.

GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behaviour genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, Phoenix, v. 67, n. 4, p. 773-782, Dec. 2000.

GIAQUINTO, P. C.; VOLPATO, G. L. Chemical communication, aggression, and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 1333-1338, Dec. 1997.

GODWIN, J. Social determination of sex in reef fishes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 20, n. 3, p. 264-270, May 2009.

GOETZ, F. W.; GARCYNYSKI, M. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 33-38, Dec. 1997.

GOMES, H. L.; FANTINATO, F. M.; BERNARDI, M. M. Determinação do sexo em neon goby (*Elacatinus* sp.–Pisces: Gobiidae) por meio de análises comportamentais Sexual determination by a behavioral method infineon goby (*Elacatinus* sp.–Pisces: Gobiidae). **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 7–10, 2009.

GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; MARIGUELA, T. C. Social isolation and aggressiveness in the Amazonian juvenile fish *Astronotus ocellatus*. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, São Carlos, v. 66, n. 1, p. 233–238, fev. 2006.

GRAVES, J. M.; PEICHEL, C. L. Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options? **Genome Biology**, London, v. 11, n. 4, p. 205, 2010.

GRIER, H. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: centropomidae). **Journal Morphology**, Philadelphia, v. 243, n. 3, p. 265–281, Mar. 2000.

GURGEL, J. J. S.; FREITAS, J. V. F. Aproveitamento final do pescado dos açudes do Nordeste brasileiro após beneficiado. **Boletim do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas**, Fortaleza, v. 21, n. 1, p. 37-42, 1973.

HALLER, J. Muscle metabolic changes during the first six hours of cohabitation in pairs of male *Betta splendens*. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 1301–1303, June 1991.

HATTORI, R. S. et al. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 8, p. 2955-2959, Feb. 2012.

HINDE, R. A. **Animal Behaviour**: a synthesis of ethology and comparative psychology. New York: McGraw-Hill Book, 1970. 534 p.

HIRSCHENHAUSER, K. et al. A test of the ‘challenge hypothesis’ in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments. **Animal Behaviour**, London, v. 68, n. 4, p. 741-750, Oct. 2004.

HONEBRINK, R. **Fishing in Hawaii**: a student manual. education programme division of aquatic resours. Honolulu: Education Program, 1990. 79 p.

HSU, Y.; EARLEY, R. L.; WOLF, L. L. Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, v. 81, n. 1, p. 33–74, Feb. 2006.

HUNTINGFORD, F. A. The relationship between anti-predator behaviour and aggression among conspecifics in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. **Animal Behaviour**, London, v. 24, n. 2, p. 245–260, May 1976.

HURD, P. L. Cooperative signalling between opponents in fish fights. **Animal Behaviour**, London, v. 54, n. 5, p. 1309–1315, Nov. 1991.

IJIRI, S. et al. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 78, n. 2, p. 333–341, Feb. 2008.

IKEUCHI, T. et al. Two subtypes of androgen and progestogen receptors in fish testes. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 129, n. 2-3, p. 449–455, June 2001.

JIANG, W. et al. Effects of sexual steroids on the expression of foxl2 in *Gobiocypris rarus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 160, n. 4, p. 187–193, Dec. 2011.

JOHNSON, J. I.; AKERMAN, A. Intersexual differences in aggression in juvenile rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 52, n. 6, p. 1292–1294, June 1998.

JOHNSON, J. I.; SERNLAND, E.; BLIXT, M. Sex-specific aggression and antipredator behaviour in young brown trout. **Ethology**, Berlin, v. 107, n. 7, p. 587–599, July 2001.

JOHNSON, J. I.; WINBERG, S.; SLOMAN, K. A. Social interactions. In: SLOMAN, K. A.; WILSON, R. W.; BALSHINE, S. (Ed.). **Behaviour and physiology of fish (Fish Physiology)**. San Diego: Elsevier, 2006. p. 151–196.

KARINO, K.; SOMEYA, C. The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition.

Behavioural Processes, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 283–289, July 2007.

KAZETO, Y. et al. Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): production of biologically active recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 79, n. 5, p. 938–946, Aug. 2008.

KENT, J. et al. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination.

Development, Cambridge, v. 122, n. 9, p. 2813–2822, Sept. 1996.

KING, J. A. et al. The ecology of aggressive behavior. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 4, p. 117–138, Nov. 1973.

KITANO, T. et al. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 23, n. 2, p. 167–176, Oct. 1999.

KLÜVER, N. et al. Regulatory back-up circuit of medaka *Wt1* co-orthologs ensures PGC maintenance. **Developmental Biology**, New York, v. 325, n. 1, p. 179–188, Jan. 2009.

KOHN, Y. Y. et al. Sex identification in captive hapuku (*Polyprion oxygeneios*) using ultrasound imagery and plasma levels of vitellogenin and sex steroids.

Aquaculture, Amsterdam, v. 384–387, p. 87–93, Mar. 2013.

KOMEN, J.; YAMASHITA, M.; NAGAHAMA, Y. Testicular development induced by a recessive mutation during gonadal differentiation of female common carp *Cyprinus carpio* L. **Development, Growth & Differentiation**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 535–544, Oct. 1992.

KOOPS, M. A.; GRANT, J. W. A. Weight asymmetry and sequential assessment in convict cichlid contests. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 71, n. 3, p. 475–479, 1993.

KORTNER, T. M. et al. Genomic approach in evaluating the role of androgens on the growth of Atlantic cod (*Gadus morhua*) previtellogenic oocytes.

Comparative Biochemistry and Physiology. Part D: genomics and proteomics, Oxford, v. 3, n. 3, p. 205–218, Sept. 2008.

KORTNER, T. M.; ROCHA, E.; ARUKWE, A. Previtellogenic oocyte growth and transcriptional changes of steroidogenic enzyme genes in immature female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after exposure to the androgens 11-ketotestosterone and testosterone. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: molecular and integrative physiology**, Oxford, v. 152, n. 3, p. 304–313, Mar. 2009.

KWOK, H. et al. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors – evidence for their distinct functions in follicle development. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 72, n. 6, p. 1370–1381, June 2005.

LARSON, E. T.; O'MALLEY, D. M.; JÚNIOR MELLONI, R. H. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 94–102, Feb. 2006.

LEBRUN, C.; BILLARD, R.; JALABERT, B. Changes in the number of germ cells in the gonads of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first 10 post-hatching weeks. **Reproduction Nutrition and Development**, Paris, v. 22, n. 2, p. 405–412, 1982.

LEGAC, F. et al. Transcriptional analysis of spermatogenesis regulation by sex steroids in trout. **Cybium**, Paris, v. 32, n. 2, p. 119–121, July 2008.

LI, J.; AL-AZZAWI, F. Mechanism of androgen receptor action. **Maturitas**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 142–148, June 2009.

LILEY, N. R.; STACEY, N. E. Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983. p. 1–63.

LIU, H. et al. Characterization and gonadal expression of FOXL2 relative to Cyp19a genes in spotted scat *Scatophagus argus*. **Gene**, Amsterdam, v. 561, n. 1, p. 6–14, Apr. 2015.

LIU, Z. H.; ZHANG, Y. G.; WANG, D. S. Studies on feminization, sex determination, and differentiation of the Southern catfish, *Silurus meridionalis*: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 223–235, June 2010.

LOKMAN, P. M. et al. 11-Ketotestosterone and IGF-I increase the size of previtellogenic oocytes from shortfinned eel, *Anguilla australis*, in vitro. **Reproduction**, Cambridge, v. 133, n. 5, p. 955–967, May 2007.

LOWE-McCONNEL, L. R. H. **Ecological studies in tropical fish communities**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 400 p.

LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 367–389, Feb. 2010.

LUO, Y.-S. et al. Molecular cloning and mRNA expression pattern of Sox9 during sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 306, n. 1–4, p. 322–328, Aug. 2010.

MAIR, G. C. et al. Sex determination in the genus *Oreochromis* 2. Sex reversal, hybridisation, gynogenesis and triploidy in *O. aureus*. Steindachner. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 82, n. 2, p. 153–160, Aug. 1991.

MANK, J. E.; AVISE, J. C. Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. **Sexual Development**, Basel, v. 3, n. 2–3, p. 60–67, 2009.

MANK, J. E.; PROMISLOW, D. E. L.; AVISE, J. C. Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 87, n. 1, p. 83–93, Jan. 2006.

MANOLAKOU, P.; ANGELOPOULOU, R.; LAVRANOS, G. Sex determinants in the genome: lessons from the animal kingdom. **Collegium Antropologicum**, Zagreb, v. 30, n. 3, p. 649–52, Sept. 2006.

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

MARGIOTTA-CASALUCI, L.; SUMPTER, J. P. 5 α -Dihydrotestosterone is a potent androgen in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 171, n. 3, p. 309-318, May 2011.

MATSUDA, M. et al. DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 10, p. 3865-3870, Mar. 2007.

MILLER, W. L.; BOSE, H. S. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 52, n. 12, p. 2111-2135, Dec. 2011.

MIURA, T. et al. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. **Development**, Cambridge, v. 129, n. 11, p. 2689–2697, June 2002.

MOLES, G. et al. Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **General Comparative Endocrinology**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 75–86, Sept. 2007.

MORETZ, J. A.; MARTINS, E. P.; ROBISON, B. D. Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. **Behavioral Ecology**, New York, v. 18, n. 3, p. 556-562, Mar. 2007.

MURUGANANTHKUMAR, R.; SENTHILKUMARAN, B. Expression analysis and localization of wt1, ad4bp/sf-1 and gata4 in the testis of catfish, *Clarias batrachus*: impact of wt1-esiRNA silencing. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 431, p. 164–176, Aug. 2016.

MUUSZE, B. et al. Hypoxia tolerance of Amazon fish. Respiratory and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: molecular and integrative physiology**, Oxford, v. 120, n. 1, p. 151-156, May 1998.

NAGAHAMA, Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 38, n. 2, p. 217–229, June 1994.

NAGAHAMA, Y. et al. Regulation of oocyte maturation in fish. In:

SHERWOOD, N. M.; HEW, C. L. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1994. p. 393–439.

NAGAHAMA, Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6., 2000, Bergen. **Proceedings...** Bergen: Institute of Marine Research and University of Bergen, 2000. p. 211-222.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, Growth & Differentiation**, Nagoya, v. 50, Suppl., p. 195–219, June 2008.

NAKAMOTO, M. et al. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryzias latipes*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 344, n. 1, p. 353–361, May 2006.

NAKAMOTO, M. et al. Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 333, n. 3, p. 729–736, Aug. 2005.

NAKAMURA, I. et al. Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein Messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 144, n. 3, p. 224–231, Dec. 2005.

NAKAMURA, M. et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 281, n. 5, p. 362–372, Aug. 1998.

NAKAMURA, M.; NAGAHAMA, Y. Differentiation and development of Leydig cells and change of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 7, n. 1-6, p. 211–219, June 1989.

NAZERI, S. et al. Sexing of farmed immature beluga (*Huso huso*) using steroid hormone levels as indicators. **Comparative Clinical Pathology**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 631–635, May 2014.

NEPHEW, B. C.; BYRNES, E. M.; BRIDGES, R. S. Vasopressin mediates enhanced offspring protection in multiparous rats. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 102-106, Jan. 2010.

O'CONNELL, L. A.; DING, J. A.; HOFMANN, H. A. Sex differences and similarities in the neuroendocrine regulation of social behavior in an African cichlid fish. **Hormone Behavior**, New York, v. 64, n. 3, p. 468-476, Aug. 2013.

OKUMURA, H. et al. Changes in hepatic vitellogenin mRNA levels during oocyte development in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **General Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 125, n. 1, p. 9–16, Jan. 2002.

OLIVEIRA, R. F.; CARNEIRO, L. A.; CANÁRIO, A. V. M. Behavioural endocrinology: **no hormonal response intied fights**. **Nature, London**, v. 437, p. 207-208, Sept. 2005.

OLIVEIRA, R. F. et al. Social modulation of androgen levels in male teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: biochemistry & molecular biology**, Oxford, v. 132, n. 1, p. 203–215, May 2002.

OSPINA-ALVAREZ, N.; PIFERRER, F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 7, p. 2837, July 2008.

OTA, K. et al. Evolution of heteromorphic sex chromosomes in the order Aulopiformes. **Gene**, Amsterdam, v. 259, n. 1-2, p. 25–30, Dec. 2000.

PANKHURST, N. W. Gonadal steroids: functions and patterns of change. In: ROCHA, M. J.; ARUKWE, A.; KAPOOR, B. G. (Ed.). **Fish reproduction**. Enfield: Science Publishers, 2008. p. 67–111.

PATIÑO, R.; TAKASHIMA, F. Gonads. In: TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. (Ed.). **An atlas of fish histology, normal and pathological features**. Tokyo: G. Fischer, 2005. p. 128–153.

PAVANELLI, G. C. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: VALENTI, W. C. et al. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPQ, 2000. p. 208-209.

PAVLIDIS, M. et al. Evidence of temperaturedependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 287, n. 3, p. 225–332, Aug. 2000.

PINHO-NETO, C. F. et al. Does sex influence intraspecific aggression and dominance in Nile tilapia juveniles? **Behavioural Processes**, Amsterdam, v. 105, p. 15–18, June 2014.

PINTO-PAIVA, M.; HILTON-NEPOMUCENKO, F. On the reproduction in captivity of the oscar, *Astronotus ocellatus* (Cuvier) according to the mating methods (Pisces-Cichlidae). **Amazoniana**, Manaus, v. 10, n. 4, p. 361-377, 1989.

PLANAS, J. V.; SWANSON, P.; DICKHOFF, W. W. Regulation of testicular steroid production in vitro by gonadotropins (GTH I and GTH II) and cyclic AMP in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **General Comparative Endocrinology**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 8–24, July 1993.

PRICE, J. S. The ritualization of agonistic behavior as a determinant of variation along the neuroticism/stability dimension of personality. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, London, v. 62, n. 11, p. 1107-1110, Nov. 1969.

POTTINGER, T. G. et al. Evaluation of biochemical methods for the non-destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 67, n. 6, p. 1514–1533, Dec. 2005.

RADDER, R. S. et al. Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. **Biology Letters**, London, v. 4, n. 2, p. 176–178, Apr. 2008.

RAGHUVVEER, K.; SENTHILKUMARAN, B. Isolation of *sox9* duplicates in catfish: Localization, differential expression pattern during gonadal development and recrudescence, and hCG-induced up-regulation of *sox9* in testicular slices. **Reproduction**, Cambridge, v. 140, n. 3, p. 477–487, Sept. 2010.

RÉALE, D. et al. Integrating animal temperament within ecology and evolution. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, v. 82, n. 2, p. 291–318, May 2007.

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

ROEMER, U.; BEISENHERZ, W. Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, London, v. 48, n. 4, p. 714–725, Apr. 1996.

SAKAI, N. et al. Steroid production by amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) testes at different developmental stages. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 75, n. 2, p. 231-240, Aug. 1989.

SANDRA, G. E.; NORMA, M. M. Sexual determination and differentiation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 20, n. 1, p. 101–121, Mar. 2010.

SAWATARI, E. et al. A novel transforming growth factor- β superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Developmental Biology**, New York, v. 301, n. 1, p. 266–275, Jan. 2007.

SCHARTL, M. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 14, n. 6, p. 634-641, Dec. 2004.

SCHULZ, R. W. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 390–411, Feb. 2010.

SCOTT, A. G. et al. The “YY” supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 78, p. 3–4, p. 237-251, June 1989.

SCOTT, A. P.; SUMPTER, J. P.; STACEY, N. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 183–224, Jan. 2010.

SHACKLETON, M. A.; JENNIONS, M. D.; HUNT, J. Fighting success and attractiveness as predictors of male mating success in the black field cricket, *Teleogryllus commodus*: the effectiveness of no-choice tests. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 58, n. 1, p. 1-8, May 2005.

SHAFLAND, P. L.; PESTRAK, J. M. Lower lethal temperatures of fourteen non-native fishes in Florida. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 7, n. 2, p. 149-156, Mar. 1982.

SHAPIRO, D. Y. Sex-changing fish as a manipulable system for the study of the determination, differentiation, and stability of sex in vertebrates. **The Journal of Experimental Zoology. Supplement**, New York, v. 4, Suppl., p. 132–136, 1990.

SIH, A.; BELL, A.; JOHNSON, J. C. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 19, n. 7, p. 372–378, July 2004.

SINCLAIR, A. H. et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, London, v. 346, n. 6281, p. 240–244, 1990.

SI, Y. et al. DNA methylation level of *cyp19a1a* and *Foxl2* gene related to their expression patterns and reproduction traits during ovary development stages of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Gene**, Amsterdam, v. 575, n. 2, p. 321–330, Jan. 2016.

SMITH, B. R.; BLUMSTEIN, D. T. Fitness consequences of personality: a meta analysis. **Behavioral Ecology**, New York, v. 19, n. 2, p. 448–455, 2006.

SMITH, E. K.; GUZMÁN, J. M.; LUCKENBACH, J. A. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 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**, Oxford, v. 165, n. 2, p. 125–137, 2013.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, London, v. 83, n. 1, p. 13–34, Feb. 2008.

STRUSSMANN, C. A. et al. Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. **Journal of Fish Biology**, London, v. 48, n. 4, p. 643–651, Apr. 1996.

TAKAHASHI, H. Modification of the development of female reproductive organs in the guppy, *Poecilia reticulata*, following androgen treatment in their juvenile period. **Bulletin of the Faculty Fisheries, Hokkaido**, v. 25, n. 3, p. 174–199, 1974.

THORGAARD, G. H. Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. **Science**, New York, v. 196, n. 4292, p. 900–902, May 1977.

TOKARZ, J. et al. Steroids in teleost fishes: a functional point of view. **Steroids**, Stoneham, v. 103, p. 123–144, 2015.

_____. Zebrafish and steroids : what do we know and what do we need to know ? **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 137, p. 165–173, Jan. 2013.

TUBERT, C. et al. Aggressive behavior and reproductive physiology in females of the social cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 106, n. 2, p. 193–200, May 2012.

TYLER, C. R.; SANTOS, E. M.; PRAT, F. Unscrambling the egg: cellular, biochemical molecular and endocrine advances in oogenesis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6., 2000, Bergen. **Proceedings...** Bergen: Institute of Marine Research and University of Bergen, 2000. p. 273-280.

VANDEPUTTE, M. et al. A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Genetics**, New York, v. 176, n. 2, p. 1049–1057, June 2007.

VIAYEH, R. M. et al. Biochemical and morphometric parameters as indicators of sex and gonadal stages in maturing Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 22, n. 1, p. 364–368, Dec. 2006.

VIDAL, V. P. et al. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. **Nature Genetics**, New York, v. 28, n. 3, p. 216–217, July 2001.

VIZZIANO, D. et al. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Development Dynamics**, New York, v. 236, n. 8, p. 2198–2206, Aug. 2007.

VOLFF, J. N.; SCHARTL, M. Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. **Genetica**, Dordrecht, v. 111, n. 1–3, p. 101–110, Jan. 2001.

VON HOFSTEN, J.; OLSSON, P. E. Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. **Reproduction Biology and Endocrinology**, Amsterdam, v. 3, p. 63, Nov. 2005.

WANG, D. et al. Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 320, n. 1, p. 83-89, July 2004.

WANG, L. H.; TSAI, C. L. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 286, n. 5, p. 534–537, Apr. 2000.

WEBB, A.; MAUGHAN, M.; KNOTT, M. **Pest fish profiles. *Astronorus ocellatus* – Oscar**. James Cook: ACTFR, 2007. 3 p.

WHITEMAN, E. A.; CÔTÉ, I. M. Social monogamy in the cleaner goby *Elacatinus evelynae*: ecological constraints or net benefit? **Animal Behavior**, Washington, v. 66, p. 281-91, 2003.

WOLF, M. et al. Life-history trade offs favour the evolution of animal personalities. **Nature**, London, v. 447, n. 7144, 581-584, 2007.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.). **Fish physiology**: volume 3. London: Academic Press, 1969. p. 117–175.

YOKOI, H. et al. Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 63, n. 1, p. 5–16, Sept. 2002.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1 - IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM *Astronotus ocellatus* POR
MEIO DA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO AGRESSIVO E
DOSAGEM DE ESTERÓIDES SEXUAIS**

Artigo segue as normas e formato do periódico *Aquaculture** ao qual será submetido

*Este artigo é um versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

Identificação do sexo em *Astronotus ocellatus* por meio da avaliação do comportamento agressivo e dosagem de esteróides sexuais

Aline F. S. de Carvalho^{a, b}, Tássia F. D. Castro^a, Isadora de L. Assis^a, Isadora M. Paiva^c Victor F. R. Mansur, Viviane de O. Felizardo^a, Fábio R. P. Bruhn^a, Luis D. S. Murgas^{a*}

^a Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil

^b Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Vale do Rio Verde (Unincor), Três Corações, Minas Gerais, Brasil

^c Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

* Autor para correspondência: Luis David Solis Murgas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Caixa postal: 3037, Cep: 37.200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: lsmurgas@dmv.ufla.br

Resumo

A identificação do sexo em peixes é imprescindível para a reprodução em cativeiro, particularmente em espécies que não apresentam dimorfismo sexual e cromossomos sexuais heteromórficos, na qual inclui o *Astronotus ocellatus*. Sendo assim, objetivou-se com este estudo identificar o sexo nessa espécie por meio de dois métodos diferentes de sexagem, por avaliação do comportamento agressivo e perfil de esteróides sexuais. O comportamento agressivo foi avaliado pelo teste do espelho, quantificando-se a latência, os ataques específicos e totais. A dosagem da testosterona (T) e 17 β -estradiol (E₂) foi determinada por meio do teste de ELISA. A análise histológica das gônadas foi realizada como padrão ouro de sexagem, a fim de validar as análises e determinar o estágio de maturação sexual. As análises estatísticas foram realizadas por meio do

software SPSS 20.00, sendo o Kappa de Cohen utilizado para avaliar a concordância entre os métodos de sexagem. Os testes t de Student ou Mann-Whitney foram aplicados para avaliar as possíveis diferenças no comportamento e perfil hormonal. Não foi possível identificar o sexo por meio da avaliação do comportamento agressivo ($p = 0,613$ e índice de concordância de 0,069). Por outro lado, a determinação da relação T/E₂ possibilitou identificar o sexo com eficácia de 80,56% ($p=0,001$ e índice de concordância de 0,571). Foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) nos níveis de T e E₂ entre machos e fêmeas. Pode-se concluir que, nas condições em que o experimento foi realizado, a identificação do sexo em *A. ocellatus* por dosagem de esteróides sexuais foi validada. Assim, esse método pode ser utilizado para prever, antecipadamente, o sexo em *A. ocellatus*.

Palavras-chaves: Agressividade. Andrógenos. Estrógenos. Sexagem. Oscar.

1. Introdução

Astronotus ocellatus, popularmente conhecido com oscar, apaiari ou acará-açu, é uma espécie nativa da América do Sul, sendo encontrada, originalmente, na bacia do rio Amazonas, incluindo Peru, Colômbia e Brasil (Pavanelli, 2000). Com crescente interesse econômico, é uma espécie de grande representatividade para o comércio, principalmente para a aquariorfilia devido as suas características morfológicas marcantes. Além disso, é um peixe bastante apreciado para consumo na região Norte

e Nordeste do Brasil por apresentar carne saborosa, firme e sem espinhas intramusculares (Gurgel e Freitas, 1973).

Característica reprodutiva marcante de *A. ocellatus* é o fato da espécie apresentar acasalamento monogâmico, formando casais que permanecem unidos por toda a vida (Enquist e Jakobsson, 1986). Em função disso, para se obter sucesso na criação em cativeiro, é necessário manter uma relação adequada entre machos e fêmeas nos tanques de cultivo, a fim de reduzir o estresse e permitir a formação dos casais (Pinto-Paiva e Nepomuceno, 1989). Entretanto, a ausência de dimorfismo sexual e de cromossomos sexuais heteromórficos dificultam a realização da sexagem para a seleção de reprodutores (Fontenele, 1982; Brunelli et al., 2010).

Geralmente, a seleção de reprodutores é realizada apenas durante a fase reprodutiva por meio de um conjunto de características externas subjetivas. Tais características incluem, em fêmeas, abdômen abaulado e hiperemia da papila urogenital, e em macho, liberação de pequena quantidade de sêmen por massagem abdominal (Crepaldi et al., 2006). Em *A. ocellatus* pode ser observado também uma alteração na coloração do corpo, que tende a se acentuar especialmente na base do opérculo e aparecimento de faixas verticais vermelhas no corpo (Fontenelle, 1982). Esse tipo de sexagem, além de ser subjetiva e variar extremamente entre os indivíduos, permite apenas uma identificação tardia do sexo, o que representa um entrave para a reprodução artificial.

Diante do exposto acima, a definição de métodos não tradicionais de sexagem é de extrema importância. Como consequência da sexagem adequada, é possível reduzir os gastos para a manutenção de indivíduos e

aumentar a produção final de alevinos, o que representa ganho econômico considerável. Além disso, a identificação do sexo representa uma questão imprescindível para estudos de comportamento, ecologia e genética (Chu-Koo et al., 2009).

Diferentes métodos têm sido propostos para sexagem em peixes, incluindo a avaliação do comportamento agressivo (Gomes et al., 2009) e dosagem de esteróides sexuais (Kohn *et al.*, 2013). Em relação ao primeiro método, este tem se mostrado eficaz para a diferenciação entre os sexos em peixes (Gomes et al., 2009) e baseia-se no fato de que em diferentes espécies a agressividade é fortemente influenciada pelo sexo (Archard e Braithwaite, 2011; Arnott e Elwood, 2009). A dosagem de esteróides sexuais como a testosterona (T), 11-ketotestosterona (11-KT) e 17 β -estradiol (E₂) também é uma abordagem utilizada com sucesso em uma ampla variedade de espécies de peixes (Chu-Koo et al., 2009; Viayeh et al., 2006). Os níveis plasmáticos desses hormônios variam consideravelmente em função do sexo, sendo os andrógenos (T e 11-KT) e estrógenos (E₂) especialmente relacionados ao desenvolvimento testicular e ovariano, respectivamente (Devlin e Nagahama, 2002; Kortner et al., 2008).

Em *A. ocellatus*, a identificação do sexo baseia-se no formato da abertura urogenital, sendo circular em machos e em forma de fenda transversal em fêmeas. Entretanto, em animais pequenos esta diferenciação é difícil de ser realizada, além de ser um método pouco confiável e subjetivo (Pinto-Paiva e Nepomuceno, 1989). Sendo assim, objetivou-se com este trabalho identificar o sexo nesta espécie por meio de dois métodos diferentes de sexagem: avaliação do comportamento

agressivo e dosagem de esteróides sexuais. Especificamente, objetivou-se: (1) estabelecer pontos de corte que permitam a identificação do sexo para a frequência de ataques agressivos totais e para a relação entre os níveis de T e E₂ (T/E₂); (2) estabelecer as diferenças para o comportamento agressivo (latência, ataques específicos e totais) entre as duas classes de sexo e (3) estabelecer as diferenças para a concentração de esteróides sexuais entre as duas classes de sexo.

2. Material e métodos

2.1. Local, animais e período pré-experimental

O experimento foi realizado no Laboratório Multiusuário – Biotério de Animais, da Universidade Federal de Lavras. Juvenis de *A. ocellatus*, com aproximadamente dois meses de idade, peso médio de $7,28 \pm 1,2$ g e comprimento total médio de $8,34 \pm 0,89$ cm, foram doados pela piscicultura Santa Mônica, sediada na cidade de Muriaé, Minas Gerais. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFLA e registrado conforme protocolo 052/2013.

O período pré-experimental teve duração de, aproximadamente, cinco meses. Durante este período, os animais foram mantidos em caixa d'água de polietileno de 500 L com sistema de recirculação de água, aeração constante por compressor de ar e pedra porosa e temperatura controlada por termostato. Esse tempo foi estipulado para que os animais atingissem a idade de sete meses, necessária para a realização do experimento. A escolha da idade baseou-se na observação prévia em

laboratório do aumento na agressividade nessa faixa etária, caracterizada por visualização de lutas entre os animais, perda de escamas e lesões no corpo.

Os animais foram alimentados com ração comercial extrusada, com teor de 32% de proteína bruta (Fri-Aqua Juvenil®). O alimento foi ofertado duas vezes ao dia, às 8 h e 16 h, *ad libitum*. As caixas d'água foram sifonadas duas vezes ao dia, às 9 h e 17 h, sendo retirada, em média, 50 % do volume total. A temperatura da água ($27\pm 0,5$ °C) foi verificada por meio de termômetro de mercúrio com escala de 1°C duas vezes ao dia, às 9 h e 17 h. Foram quantificados, semanalmente, pela manhã, o pH ($6,9\pm 0,56$) e teor de amônia ($0,28\pm 0,1$ mg/l) através de kits comerciais colorimétricos (Alcon, Labcon test for pH Tropical e Toxic Ammonia, Bazil). O fotoperíodo foi mantido em 12 h de luz e 12 h de escuro.

2.2. Período experimental e teste do espelho

O período experimental correspondeu ao período de isolamento social (físico e visual) dos animais, necessário para a avaliação do comportamento agressivo (Arnott e Elwood, 2009; Gomez-Laplaza e Morgan, 2000), com duração de 15 dias (Gonçalves-de-Freitas e Mariguela, 2006). Para o isolamento físico, os animais foram mantidos em aquários individuais e, para impedir o contato visual entre eles, as laterais dos aquários foram revestidas com papel contate azul.

Um total de 48 *A. ocellatus* adultos, com peso médio de $51,58\pm 11,12$ g e comprimento total médio de $13,58\pm 0,96$ cm, foi

selecionado aleatoriamente, e distribuídos, individualmente, em aquários de vidro de 40 L com sistema de recirculação de água, aeração constante por compressor de ar e pedra porosa e temperatura controlada por termostato. A alimentação e manejo mantiveram-se os mesmos aos realizados durante o período pré-experimental. A temperatura, o pH e teor de amônia da água, foram, respectivamente, de, $27\pm 0,5$ °C, $7,2\pm 0,4$ e $0,13\pm 0,08$ mg/ml. O fotoperíodo foi mantido em 12 h de luz e 12 h de escuro.

Ao final de 15 dias, a agressividade foi avaliada por meio do teste do espelho. Assim, os animais foram mantidos em jejum por 24 h, capturados com auxílio de puçá e transferidos para aquários testes com capacidade volumétrica de 40 L, revestidos com papel contate azul. Após 30 min de aclimatização, o espelho foi posicionado dentro do aquário teste e o comportamento de cada animal gravado em vídeo durante 15 min, conforme descrito adiante no item 2.5. Estes procedimentos foram realizados pela manhã, entre 8-11 h.

2.3. Coleta de sangue e coleta das gônadas

Imediatamente após o teste do espelho, os animais foram retirados dos aquários testes e anestesiados em benzocaína (150 mg/l de água) para coleta de sangue. A amostra sanguínea foi obtida promovendo-se a contenção e posicionamento lateral do animal para punção. Foi coletado, aproximadamente, 0,3 mL de sangue da veia caudal com seringa de 1 mL e agulhas calibre 13 x 4,5 (26 G $\frac{1}{2}$ ”) com o anticoagulante (EDTA). Para obtenção do plasma sanguíneo, as amostras foram transferidas para tubos

e centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos. O plasma foi então armazenado a -80 °C até a realização das análises de dosagem hormonal.

Na sequência, os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia em solução de benzocaína (250 mg/L) para coleta das gônadas. Com auxílio de tesoura, cada peixe foi incisado ventralmente, da papila urogenital até a base da nadadeira peitoral, sendo as vísceras retiradas cuidadosamente, conservando-se as gônadas. As gônadas foram retiradas, pesadas e fixadas em solução de Bouin por 24 horas sendo posteriormente transferidas para álcool etílico 70%.

2.4. Análise histológica das gônadas

As amostras de gônadas foram processadas por técnicas histológicas rotineiras e as lâminas coradas por hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas sob microscopia óptica de campo claro com objetiva de 40X e o sexo identificado de acordo com as características histológicas do ovário e testículos. Este método de sexagem foi considerado padrão ouro para validação dos métodos de sexagem propostos.

O estágio de desenvolvimento gonadal e a maturidade sexual dos animais foram determinados com base nas características morfológicas do ovário e testículo (Wallace e Selman, 1981; Godinho et al., 2005). Os peixes, incluindo machos e fêmeas, foram categorizados em três grupos diferentes: (1) estágio I, em repouso; (2) estágio II, em maturação inicial e (3) estágio III, em maturação final. A Tabela 1 apresenta as principais características em cada estágio de desenvolvimento gonadal.

Tabela 1 Características histológicas dos estágios de desenvolvimento gonadal em machos e fêmeas de *A. ocellatus*

Estágio	Características	
	Macho	Fêmea
I – Repouso	Caracterizado pela presença apenas de espermatogônias	Presença somente de ovócitos cromatino-nucléolo e ovócitos perinucleares.
II - Maturação Inicial	Cistos espermáticos repletos de espermatócitos primários, secundários e espermátides e pequena quantidade de espermatozóides no lúmen.	Presença de ovócitos cromatino-nucléolo, perinucleares e ovócitos pré-vitelogênicos com grânulos corticais e vesículas de vitelo.
III - Maturação final	Presença de todos os tipos celulares e espermatozóides em grande quantidade na parte central do lúmen seminífero (Espermatogênese completa).	Presença de ovócitos cromatino-nucléolo, perinucleares e pré-vitelogênicos. Adicionalmente, grande quantidade de ovócitos vitelogênicos

2.5. Avaliação do comportamento agressivo

A motivação agressiva dos peixes foi avaliada a partir da análise dos vídeos gravados durante o teste do espelho. Assim, determinou-se a latência para início do comportamento agonístico e a frequência, em 15 min, dos ataques específicos e totais direcionados ao espelho. Segundo a metodologia proposta por Gonçalves-de-Freitas e Mariguela, (2006), os seguintes parâmetros foram quantificados: (1) latência, tempo em que o

animal demora para exibir o primeiro ataque ao espelho, (2) “*mouth fighting*”, o peixe toca e empurra o espelho com a boca, nadando para cima e para baixo, ondulando o seu corpo; (3) “*butting*”: o peixe se aproxima do espelho e toca-o rapidamente com a boca; (4) “*tail beating*”, o peixe posiciona-se em paralelo ao espelho e ondula seu corpo, batendo a cauda contra o vidro. Esse comportamento pode ocorrer com a boca na posição horizontal ou direcionada para o espelho; (5) “*frontal display*”, o peixe fica de frente para o espelho a poucos centímetros e nada para cima e para baixo (6) total de ataques, soma de todos os eventos agressivos.

2.6. Dosagem dos esteróides sexuais

Para avaliar o nível de esteróides sexuais (T e E₂) foram utilizadas amostras sanguíneas de 36 animais, uma vez que, não foi possível obter sangue de todos os peixes. A dosagem plasmática desses hormônios foi realizada por meio de kits comerciais de ELISA (Enzo Life Science). Estes kits são imunoenaios de competição que utilizam anticorpo monoclonal e policlonal para T e E₂, respectivamente. Os protocolos de ensaio foram realizados de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. As amostras plasmáticas foram diluídas no tampão de ensaio, fornecido pelo kit, na proporção de 1:16 e 1:12 para T e E₂, respectivamente. A absorbância foi lida em leitora de placa de ELISA a 405 nm e os resultados analisados em software online (<http://elisaanalysis.com>) para análise de dados de ELISA, utilizando curva logística de cinco parâmetros.

2.6. Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas por meio do software estatístico SPSS 2.0. Para avaliar o grau de concordância entre duas variáveis qualitativas com categorias homólogas X e Y, ou seja, a concordância entre o método de sexagem proposto (avaliação do comportamento agressivo e dosagem dos esteróides sexuais) e a sexagem padrão ouro (análise histológica das gônadas), foi utilizado o Kappa de Cohen, e seu intervalo de confiança a 95%. Assim, em caso de concordância, foi estabelecido pontos de corte em função da média dos dados. Para avaliar possíveis diferenças na quantidade de hormônios sexuais e comportamento agressivo entre machos e fêmeas foram aplicados testes t de Student ou Mann-Whitney, este quando não foi observada distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Considerou-se um nível mínimo de significância de 95% em todas as análises estatísticas.

3. Resultados

3.1. Análises histológicas das gônadas

Baseado nas observações histológicas das gônadas, de um total de 48 animais avaliados, 33 deles eram fêmeas e 15 machos. Histologicamente, o ovário foi caracterizado pela presença de ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento dentro das lamelas ovíferas. A proporção de cada tipo de ovócito variou em função do estágio de desenvolvimento gonadal (Fig. 1A). O testículo, por sua vez, foi

caracterizado por sua estrutura tubular, coberta por uma camada de tecido conjuntivo-muscular. Os túbulos seminíferos (cistos espermáticos) eram dispostos radialmente, com presença de células espermáticas em diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 1B).

Em relação ao desenvolvimento gonadal, considerando as fêmeas, 70% (22 animais) estavam em estágio III de desenvolvimento, ou seja, em maturação avançada, caracterizada pela presença de grande quantidade de ovócitos vitelogênicos. Dentre os demais, 30% (10 animais) estavam em estágio II, em maturação inicial, com a presença de ovócitos pré-vitelogênicos em maior abundância. Apenas 3% (1 animal) estava em estágio I em repouso, com presença predominante de ovócitos cromatino-núcleo e perinucleares. Em contrapartida, 80% dos machos (12 animais), encontravam-se em estágio II, em maturação inicial, com pequena quantidade de espermatozóides no lúmen do testículo. O restante, 20% (3 animais) encontravam-se em estágio I em repouso com presença abundante de espermatogônias.

3.2. Eficácia da sexagem por avaliação do comportamento agressivo e perfil agressivo em função do sexo

Para o Kappa de Kohen, o valor de $p=0,613$ e índice= $0,069$ indicam a não concordância entre as variáveis avaliadas, ou seja, entre a sexagem proposta (comportamento agressivo por avaliação dos ataques totais) e a sexagem padrão ouro (análise histológica das gônadas). Assim, não foi possível identificar o sexo dos animais a partir de um ponto de corte em função da média.

A avaliação do comportamento agressivo por meio do teste do espelho revelou que não houveram diferenças significativas ($p>0,05$) entre o sexo para latência ($87,26\pm 93,83$ s para as fêmeas e $131,8\pm 167,70$ s para os machos), ataques específicos e ataques totais. Independente do sexo, a maior frequência observada foi para o ataque “*butting*”, seguido de “*tail beating*”, “*frontal display*”, e, por último, “*mouth fighting*” (Fig. 2).

3.4. Eficácia da sexagem por dosagem de esteróides sexuais (T/E₂) e perfil hormonal em função do sexo

A razão T/E₂ foi utilizada para identificar o sexo. Os machos apresentaram, significativamente ($p=0,001$), maior razão T/E₂ (0,70) do que as fêmeas (0,24). Em relação ao Kappa de Kohen, o valor de $p=0,001$ e o índice de concordância de 0,571 (57,10%) indicam a existência de boa concordância entre a sexagem proposta (razão T/E₂) e a sexagem padrão ouro (análise histológica das gônadas). Considerou-se a média (0,45) dos valores de T/E₂ como ponto de corte para diferenciar os machos das fêmeas. Assim, animais com valores superiores a 0,45 foram identificados como machos, enquanto que, valores inferiores ao ponto de corte foram atribuídos às fêmeas (Fig. 3).

A eficácia média da sexagem por esse método foi de 80,56%, sendo identificados erroneamente 12% das fêmeas e 20% dos machos. Todos os três machos identificados erroneamente encontravam-se em estágio I de repouso, com níveis elevados de E₂ (6,61, 4,70, e 4, 57 ng/ml), o que resultou em valores de T/E₂ menores que 0,45. Em

contrapartida, do total de quatro fêmeas identificadas erroneamente, duas delas em estágio II de desenvolvimento gonadal, apresentaram níveis elevados de T (2,54 e 3,82 ng/ml), superior ao valor mediano encontrado para as fêmeas (1,23 ng/ml). Além disso, embora em estágio III, as outras duas fêmeas identificadas como machos apresentaram níveis baixos de E₂ (1,03 e 1,09 ng/ml). Assim, para esses animais, a relação entre T/E₂ foi maior que 0,45 (Fig. 3).

Os níveis de T plasmático para machos variaram na ordem de 0,82 a 2,92 ng/ml. Para as fêmeas, os valores para T permaneceram entre 0,62 e 3,82 ng/ml. Embora o maior valor absoluto individual tenha sido observado nas fêmeas (3,82 pg/ml), os machos apresentaram valores medianos de T significativamente ($p=0,032$) maiores (1,88 ng/ml) quando comparado as fêmeas (1,23 ng/ml) (Fig. 4). Em machos, os níveis plasmáticos de E₂ tiveram variação na ordem de 1,42 e 4,70 ng/ml. Já para as fêmeas, esses valores permaneceram entre 1,04 e 72,45 ng/ml. Em geral, as fêmeas obtiveram valores medianos de E₂ significativamente ($p=0,002$) maiores (6,40 ng/ml) quando comparados aos machos (2,63 ng/ml) (Fig.4).

4. Discussão

4.1. Análises histológicas das gônadas

A análise histológica revelou que a gônada de *A. ocellatus* apresenta características morfológicas comuns aos peixes (Wallace e Selman 1981; Schulz et al., 2010). Além disso, considerando o grupo de animais avaliados e as condições experimentais aqui estabelecidas, pode-

se sugerir que a maturidade sexual ocorreu precocemente nas fêmeas, uma vez que, há predomínio de fêmeas em estágio III e machos em estágio II. Este resultado opõe-se ao preconizando anteriormente para a espécie, onde maior precocidade sexual foi observada em machos, em torno de 7-10 meses, comparado aos 10-12 meses em fêmeas (Flores, 1986). Por outro lado, Fontenele (1982) destaca que, na natureza, a primeira maturação ocorre igualmente em ambos os sexos, entre 10-12 meses. Além do fator idade, o tamanho dos animais exerce forte influência sobre a idade a primeira maturidade sexual. Segundo Robins (2007), *A. ocellatus* atinge a maturidade sexual com tamanho aproximado de 12 cm, o que vai de encontro ao tamanho dos exemplares utilizados no presente estudo, com tamanho médio de $13,58 \pm 0,96$ cm.

Assim, condições diferentes de cultivo são capazes de influenciar diretamente na idade à primeira maturidade. A criação do *A. ocellatus* em cativeiro no presente estudo contribuiu para a antecipação do desenvolvimento gonadal, onde fêmeas com sete meses de idade já se encontravam em estágio de maturação final. Tal fato se deve, principalmente, as condições favoráveis de cultivo, tais como, controle da temperatura e fotoperíodo e fornecimento adequado de alimento.

4.2. Eficácia da sexagem por avaliação do comportamento agressivo e perfil agressivo em função do sexo

O teste do espelho tem sido muitas vezes utilizado para avaliar a agressividade em peixes e mimetizar o comportamento do animal frente ao espelho, fornecendo a imagem de um indivíduo co-específico. A sua

principal vantagem é a redução do desafio, quando comparado ao emparelhamento de dois animais, além de permitir maior controle na mensuração da agressão (Archard e Braithwaite, 2011). No presente estudo, o uso de tal teste permitiu avaliar a agressividade de maneira eficiente, entretanto, não foi possível diferenciar o sexo em *A. ocellatus* por meio da avaliação do comportamento agressivo.

A ineficácia da sexagem por este método pode estar associado ao fato de que, dependendo da espécie, a manifestação das diferenças sexuais no comportamento pode ser muitas vezes observada apenas durante o evento reprodutivo, o que dificulta a sexagem por avaliação da agressividade em animais mais jovens. Reprodutores de *A. ocellatus*, assim como em outras espécies de ciclídeos, podem se tornar mais agressivos em função do padrão comportamental de cuidado parental (Beeching, 1997).

Outros métodos subjetivos de sexagem em peixes, por exemplo, análise da conformação da papila urogenital e da coloração do corpo, também mostraram-se ineficazes para outras espécies. Estes parâmetros de análises estão relacionados, especialmente, a mudanças fenotípicas durante a fase reprodutiva e comportamento de corte, o que pode justificar o seu insucesso (Falahatkar e Poursaeid, 2013). Além disso, a semelhança no perfil de comportamento agressivo entre machos e fêmeas, independente do tipo de ataque, também pode ter impossibilitado a definição de pontos de corte na qual permitisse a diferenciação entre os sexos. É importante ressaltar que, embora não tenha apresentado diferenças significativas, biologicamente, observa-se uma tendência das

fêmeas serem mais agressivas, o que foi evidenciada por uma maior frequência dos ataques totais (Fig 2).

Em oposição ao que ocorreu em *A. ocellatus*, outras espécies de peixes apresentam a agressividade marcadamente influenciada pelas diferenças sexuais. Em acará do Congo (*Amatitlania nigrofasciata*), foram observadas diferenças evidentes na tática de ataque entre machos e fêmeas envolvidos em encontros agonísticos intrasexual (Arnott e Elwood, 2009). Em *Brachyrrhaphis episcopi*, as fêmeas são mais agressivas em populações de baixa predação, e a principal motivação para tal é o acesso ao recurso alimentar. Em contrapartida, os machos dispõem de maior agressividade na presença de alta predação, motivado pela disputa hierárquica pela fêmea (Archard e Braithwaite, 2011).

Outras espécies que também apresentam diferenças comportamentais em função do sexo incluem o peixe betta (*Betta splendens*) (Karino e Someya, 1991) e a truta marrom (*Salmo trutta*), onde os machos são mais agressivos (Johnsson et al., 2001; Johnsson e Akerman, 1998), e a tilápia (*Sarotherodon melanotheron*) em que as fêmeas são mais agressivas devido, principalmente, ao cuidado parental.

Em contrapartida, em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) os resultados foram semelhantes ao encontrado no presente estudo, sendo observada similaridade na agressividade entre os sexos (Pinho-Neto et al., 2014). Possível explicação pode estar relacionada à motivação a agressividade. Em animais jovens, a principal motivação agressiva ocorre em função da disputa por recursos alimentares e território (Ridley et al., 1995). Sendo assim, as condições adequadas de alimentação e o

isolamento social, contribuíram, em parte, para os resultados encontrados em *A. ocellatus*.

Em relação à frequência dos ataques específicos em *A. ocellatus*, independente do sexo, a maior frequência observada foi para o “*butting*” (12 para machos e 14 para fêmeas) e “*tail beating*” (7 para machos e 8 para fêmeas). Esses tipos de ataque são considerados extremamente agressivos e está de acordo com o relatado previamente por Gonçalves-de-Freitas e Mariguela (2006) para essa mesma espécie. Segundo esses autores, a alta agressividade em *A. ocellatus* pode ser mediada pelo efeito de exposição prévia, residência prévia ou por processos envolvendo reconhecimento de co-específicos.

As diferenças interespecíficas na agressividade em peixes são controladas por diversos outros fatores, não podendo ser atribuída exclusivamente ao sexo. Dentre as principais variáveis pode-se destacar o status social de dominância ou subordinação (O’Connell et al., 2013), o tamanho dos animais (Arnott e Elwood, 2009), a maturidade sexual (Johnsson et al., 2001) e diferenças genéticas inerentes a cada indivíduo (Johnsson e Akerman, 1998). Assim, os resultados encontrados nesse estudo sugerem que, em *A. ocellatus*, a agressividade é controlada por outros fatores, como por exemplo, o status social e a maturação sexual, sendo necessárias mais investigações a fim de elucidar essas hipóteses.

4.4. Eficácia da sexagem por dosagem de esteróides sexuais (T/E₂) e perfil hormonal em função do sexo

Em *A. ocellatus*, a dosagem plasmática de esteróides sexuais, através da relação entre T e E₂, mostrou-se eficaz (80,57%) para a identificação do sexo, o que está de acordo com estudos anteriores. Os níveis plasmáticos de 11-KT e E₂ foram preditores confiáveis para a diferenciação entre os sexos em esturjão (*Acipenser persicus*), sendo 100% eficaz em animais sexualmente desenvolvidos (Viayeh et al., 2006). Semelhantemente, Chu-Koo et al., (2009) foram capazes de identificar o sexo em piraruru (*Arapaima gigas*) com eficácia de 100%.

Em estudo proposto por Kohn et al., (2013), esta mesma metodologia mostrou-se 100% precisa para a identificação do sexo em cherne azul (*Polyprion oxygeneios*) sexualmente desenvolvidos. Em contrapartida, em *Acipenser persicus* (Viayeh et al., 2006) e *Polyprion oxygeneios* (Kohn et al., 2013) sexualmente subdesenvolvidos esse método foi ineficaz. Esses resultados refletem a limitação em utilizar esta técnica em animais imaturos.

A eficácia desse método de sexagem depende de uma série de variáveis, sejam elas associadas a fatores biológicos, ambientais ou metodológicos. Assim, dentre os fatores biológicos pode-se citar as variações interespecíficas e intraspecíficas, relacionados ao padrão de secreção dos esteróides sexuais. Como fatores ambientais, pode-se destacar as condições de alimentação, estresse, presença de patógenos, entre outros (Falhatkar et al., 2013). Metodologicamente, o tipo de andrógeno avaliado (T ou 11KT), o contexto e a técnica utilizada para

quantificação dos hormônios, são fontes de variações importantes (Potinger et al., 2005).

No presente estudo, a identificação errônea dos três machos pode ser atribuída ao estágio de desenvolvimento gonadal, uma vez que, estes se encontravam em estágio I em repouso com níveis elevados de E_2 . Durante a fase de repouso, níveis maiores de E_2 podem estar relacionados à sua função na proliferação das espermatogônias (Kortner et al., 2008). Portanto, a sexagem através da relação T/E_2 mostrou-se ineficaz para estes animais, principalmente, pela imaturidade sexual. Por outro lado, para as quatro fêmeas identificadas erroneamente, os níveis elevados de T em duas delas e o baixo nível de E_2 nas outras duas, não pode ser diretamente atribuída à maturidade sexual. Assim, é necessário mais investigações a fim de elucidar tais achados.

Diante do exposto acima, a fim de melhorar a eficácia desta sexagem, uma alternativa seria estabelecer outros pontos de corte que melhor representassem os animais. Além disso, a associação de diferentes métodos de sexagem, como por exemplo, avaliação ultrassonográfica (Kohn et al., 2013), dosagem da vitelogenina (Chu-Koo et al., 2009; Kohn et al., 2013) e uso de marcadores moleculares (Bruneli et al., 2010; Silva et al., 2012) é uma alternativa viável a fim de aumentar o sucesso na identificação do sexo.

A dosagem de esteróides sexuais em *A. ocellatus* permitiu identificar um padrão hormonal influenciado pelo sexo. Assim, machos apresentaram níveis plasmáticos maiores de T em comparação as fêmeas que, em contraponto, obtiveram valores superiores de E_2 . Esses achados corroboram o fato já preconizado de que os hormônios envolvidos com a

reprodução são regulados por fatores inerentes ao sexo. Em geral, pode-se considerar que, os andrógenos (T e 11-KT) e estrógenos (E_2) são responsáveis por controlar a maturidade sexual em machos e fêmeas, respectivamente (Kortner et al., 2008).

Em fêmeas de *A. ocellatus*, houve predomínio considerável do E_2 (6,40 ng/mL) em relação a T (1,23 ng/ml). Esses resultados estão de acordo com os demais encontrados na literatura, na qual indicam a presença de níveis plasmáticos elevados de E_2 e baixos níveis de T em fêmeas. Por exemplo, em esturjão (*Acipenser persicus*), sexualmente maduras, os níveis de E_2 e T foram de 7 ng/mL e 0,13 ng/mL, respectivamente (Viayeh et al., 2006). Já para cherne azul (*Polyprion oxygeneios*) o pico de E_2 em animais adultos foi de 5,66 ng/mL, enquanto que, o maior valor observado para T foi de 0,87 ng/mL (Kohn et al., 2013).

Estes resultados podem ser atribuídos ao estágio de desenvolvimento gonadal. O nível elevado de E_2 observado em *A. ocellatus*, e nas demais espécies, está intimamente relacionado à presença de ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos no ovário, típico de animais em maturação inicial e avançada. Sabe-se que, dentre as diferentes funções do E_2 , a principal delas é estimular a síntese hepática da vitelogenina (King e Pankhurst, 2003; Lubzens et al., 2010). Sendo assim, a necessidade em acumular grânulos de vitelo durante as fases de maturação resultou em níveis elevados de E_2 durante a fase de vitelogênese.

Em contrapartida, embora em menor nível, a presença de T plasmática em fêmeas pode estar associada a sua função principal como

precursora para síntese de E_2 . Sendo assim, ambos os hormônios estariam envolvidos, de forma concomitante, com o processo de maturação dos ovócitos (Suresh et al., 2008). Além disso, possível ação dos andrógenos em fêmeas seria auxiliar no crescimento inicial dos ovócitos (Kazeto et al., 2011).

Em machos, o nível plasmático de T foi, em média, significativamente maior do que nas fêmeas. No entanto, esse nível foi relativamente baixo (1,88 ng/mL) o que pode ser atribuído ao estágio de desenvolvimento gonadal. Feist et al. (2004) observaram que à medida que a maturidade sexual avança os níveis de andrógenos também aumentam (acima de 2 ng/mL). De maneira semelhante, em pirarucu (*Arapaima gigas*) níveis elevados de T (2,63 ng/ml) só foram observados em animais adultos sexualmente maduros (Chu-Koo et al., 2009). A principal função dos andrógenos em machos é estimular a fase final da espermatogênese e espermiogênese, sendo níveis plasmáticos elevados de T e 11-KT comum a animais adultos (Kortner et al., 2008). Sendo assim, no presente estudo, em função dos animais encontrarem-se em maturidade sexual inicial, ou até mesmo em repouso, a baixa produção de T é justificada.

Outra possível explicação para o baixo nível de T centra-se na possibilidade desse hormônio não ser o principal andrógeno ativo secretado pela gônada. Em algumas espécies de peixes, o 11-KT é o principal andrógeno ativo, sendo sua concentração superior a T (Marcano et al., 2007). No entanto, há relatos de que em vários ciclideos, na qual pode incluir o *A. ocellatus*, a T é o hormônio ativo principal, em concentrações plasmáticas superiores (O’Cornell et al., 2013). Sendo

assim, é necessário mais estudos para determinar qual andrógeno teria maior atividade reprodutiva em *A. ocellatus*.

O baixo valor de E₂ (2,63 ng/mL) observado em machos, em comparação as fêmeas (6,40 ng/mL), está de acordo com resultados encontrados anteriormente para outras espécies. Em cherne azul (*Polyprion oxigeneios*) os níveis de E₂, durante todo o ciclo reprodutivo, permaneceram entre indetectáveis a 1,16 ng/mL (Kohn et al., 2013). Em pirarucu (*Arapaima gigas*), animais juvenis e adultos apresentaram valores ainda menores de E₂, entre 0,002 ng/mL a 0,048 mg/mL (Chu-Koo et al., 2009). A função básica do E₂ em machos é estimular a reposição de espermatogônias tronco, além de manutenção fisiológica das células de Sertoli (Kortner et al., 2008), o que explica a presença do E₂ plasmático em machos durante a fase de repouso e maturação inicial.

5. Conclusões

A partir dos resultados encontrados e, nas condições em que o experimento foi executado, pode-se concluir que, o método de dosagem dos esteróides sexuais foi validado para a identificação do sexo em *A. ocellatus*. Além disso, conclui-se que, o sexo não exerce influência alguma sobre o comportamento agressivo em *A. ocellatus*. Em contrapartida, o padrão hormonal de esteróides sexuais foi marcadamente influenciado pelo sexo.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível superior (CAPES), pelo apoio financeiro dado para execução da presente pesquisa. Os autores também agradecem à Universidade Federal de Lavras pelo suporte oferecido para o desenvolvimento dos experimentos.

7. Referências Bibliográficas

- Archard, G.A., Braithwaite, V.A., 2011. Variation in aggressive behaviour in the poeciliid fish *Brachyrhaphis episcopi*: Population and sex differences. *Behav. Processes* 86, 52–57. doi:10.1016/j.beproc.2010.09.002
- Arnott, G., Elwood, R.W., 2009. Gender differences in aggressive behaviour in convict cichlids. *Anim. Behav.* 78, 1221–1227. doi:10.1016/j.anbehav.2009.08.005
- Barcellos, L.J., Wassermann, G.F., Scott, a P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Itzéz, I., Krieger, M.H., Lulhier, F., 2001. Steroid profiles in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 325–332. doi:10.1006/gcen.2001.7603
- Beeching, S.C., 1997. Functional groups in the social behavior of a cichlid fish, the Oscar, *Astronotus ocellatus*. *Behav. Processes* 39, 85–93. doi:10.1016/S0376-6357(96)00047-2
- Brunelli, J.P., Steele, C.A., Thorgaard, G. H., 2010. Deep divergence and apparent sex-biased dispersal revealed by a Y-linked marker in rainbow trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 983–990.
- Chaves-Pozo, E., Arjona, F.J., García-López, A., García-Alcázar, A., Meseguer, J., García-Ayala, A., 2008. Sex steroids and metabolic parameter levels in a seasonal breeding fish (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 531–536. doi:10.1016/j.ygcen.2008.03.004

- Chu-Koo, F., Dugué, R., Alván Aguilar, M., Casanova Daza, A., Alcántara Bocanegra, F., Chávez Veintemilla, C., Duponchelle, F., Renno, J.F., Tello, S., Nuñez, J., 2009. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 125–136. doi:10.1007/s10695-008-9211-8
- Crepaldi, D.V.; Teixeira, E.A.; Faria, P.M.C., 2006. A ultra-sonografia na piscicultura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 39, 174-181.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish : an overview of genetic , physiological , and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364. doi:10.1016/S0044-8486(02)00057-1
- Enquist, M., Jakobsson, S., 1986. Assessment of lighting ability in the cichlid fish *Nannacara anomala*. *Ethology* 72, 143-153.
- Falahatkar, B., Akhavan, S.R., Tolouei Gilani, M.H., Abbasalizadeh, A., 2013. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon, *Huso huso* L. through biopsy. *Iran. J. Vet. Res.* 14, 133–139.
- Falahatkar, B., Poursaeid, S., 2013. Gender Identification in Great Sturgeon (*Huso huso*) Using Morphology, Sex Steroids, Histology and Endoscopy. *J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol.* 43, 81–89. doi:10.1111/ah.12049
- Falahatkar, B., Tolouei, M.H., Falahatkar, S., Abbasalizadeh, A., 2011. Laparoscopy , a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. *Aquaculture* 321, 273–279. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.08.030
- Feist, G., Van Eenennaam, J.P., Doroshov, S.I., Schreck, C.B., Schneider, R.P., Fitzpatrick, M.S., 2004. Early identification of sex in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels. *Aquaculture* 232, 581–590. doi:10.1016/S0044-8486(03)00486-1
- Fontenele, O., 1982. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus cellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução, hábitos de desova e prolificidade. *Revista Brasileira de Biologia* 11, 467-484.
- Godinho, H.P., Santos, J.E., Formagio, P.S., Guimarães-cruz, R.J., 2005. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian sh. *Acta Zool.* 294, 289–294.

- Gomes, H.L., Fantinato, F.M. Bernardi, M.M., 2009. Determinação do sexo em neon goby (*Elacatinus* sp.–Pisces: Gobiidae) por meio de análises comportamentais Sexual determination by a behavioral method infineon goby (*Elacatinus* sp.–Pisces: Gobiidae). *Rev. Inst. Ciênc. Saúde* 2, 7–10.
- Gomez-Laplaza, L.M., Morgan, E., 2000. Laboratory studies of the effects of short-term isolation on aggressive behaviour in fish. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 33, 63–102.
doi:10.1080/10236240009387083
- Gonçalves-de-Freitas, E., Mariguela, T.C., 2006. Social isolation and aggressiveness in the Amazonian juvenile fish *Astronotus ocellatus*. *Braz. J. Biol.* 66, 233–238. doi:10.1590/S1519-69842006000200007
- Gurgel, J.J.S.; Freitas, J.V.F., 1973. Aproveitamento final do pescado dos açudes do Nordeste brasileiro após beneficiado. *Boletim Técnico DNOCS, Fortaleza*, 31,37-44.
- Johnsson, È.I., Sernland, E., Blixt, M., 2001. Sex-Specific Aggression and Antipredator Behaviour in Young Brown Trout. *Ethology* 599, 587–599.
- Johnsson, J.I., Akerman, a, 1998. Intersexual differences in aggression in juvenile rainbow trout. *J. Fish Biol.* 52, 1292–1294.
doi:10.1006/jfbi.1998.0657
- Karino, K., Someya, C. 1991. The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition. *Behavioural Processes* 75, 283–289.
- Kazeto, Y., Tosaka, R., Matsubara, H., Ijiri, S., Adachi, S., 2011. Ovarian steroidogenesis and the role of sex steroid hormones on ovarian growth and maturation of the Japanese eel. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 149–154. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.013
- King, H.R., Pankhurst, N.W., 2003. Ovarian growth and plasma sex steroid and vitellogenin proWles during vitellogenesis in Tasmanian female Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 219, 797–813.
- Kohn, Y.Y., Lokman, P.M., Kilimnik, A., Symonds, J.E., 2013. Sex identification in captive hapuku (*Polyprion oxygeneios*) using ultrasound imagery and plasma levels of vitellogenin and sex steroids. *Aquaculture* 384–387, 87–93.
doi:10.1016/j.aquaculture.2012.12.020
- Kortner, T.M., Rocha, E., Silva, P., Castro, L.F.C., Arukwe, A., 2008. Genomic eapproach in evaluating the role of androgens on the

- growth of Atlantic cod (*Gadus morhua*) previtellogenic oocytes. *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics* 3, 205–218. doi:10.1016/j.cbd.2008.04.001
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367–389. doi:10.1016/j.ygcen.2009.05.022
- Marcano, D., Cardillo, E., Rodriguez, C., Poleo, G., Gago, N., Guerrero, H.Y., 2007. Seasonal reproductive biology of two species of freshwater catfish from the Venezuelan floodplains. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 371–377. doi:10.1016/j.ygcen.2007.01.042
- Nazeri, S., Mojazi Amiri, B., Nazeri, M.R., Mirvaghefi, A.R., 2014. Sexing of farmed immature beluga (*Huso huso*) using steroid hormone levels as indicators. *Comp. Clin. Path.* 23, 631–635. doi:10.1007/s00580-012-1662-8
- Newman, D.M., Jones, P.L., Ingram, B.A., 2008. Sexing accuracy and indicators of maturation status in captive Murray cod *Maccullochella peelii peelii* using non-invasive ultrasonic imagery. *Aquaculture* 279, 113–119. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.03.032
- O’Connell, L.A., Ding, J.H., Hofmann, H.A., 2013. Sex differences and similarities in the neuroendocrine regulation of social behavior in an African cichlid fish. *Horm. Behav.* 64, 468–476. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.07.003
- Pavanelli, G. C., 2000. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: Valenti, W.C, Poli, R, PEREIRA, J.A, BORGHETTI, J.R. *Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*, p 208-209. CNPQ: Brasília.
- Pinho-Neto, C.F., Miyai, C.A., Sanches, F.H.C., Giaquinto, P.C., Delicio, H.C., Barcellos, L.J.G., Volpato, G.L., Barreto, R.E., 2014. Does sex influence intraspecific aggression and dominance in Nile tilapia juveniles? *Behav. Processes* 105, 15–18. doi:10.1016/j.beproc.2014.02.003
- Pinto-Paiva, M.; Nepomuceno, F. H., 1989. On the reproduction in captivity of the oscar, *Astronotus ocellatus* (Cuvier) according to the mating methods (Pisces-Cichlidae). *Amazoniana*10, 361-377.
- Ridley, M., 1995. *Animal Behavior: An Introduction to Behavioral Mechanisms, Development and Ecology*. Blackwell Science.
- Rinchard, J., Kestemont, P., Kuhn, E.R., Fostier, A., 1993. Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous

- fish the gudgeon *Gabio gabio* L 9Teleostei, Cyprinidae). *General and Comparative Endocrinology* 92, 168-178.
- Robins R.H., 2007. *Biological Profiles: Oscar*. Education webpage for Ichthyology at the Florida Museum of Natural History. Online: www.flmnh.ufl.edu/fish/. Acessado em 10 de maio de 2016.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.013
- Silva, E.M., Wong, M.S.L, Martins,C., Wasko, A.P., 2012. Screening and characterization of sex-specific DNA fragments in the freshwater fish matrinhã, *Brycon amazonicus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1487-1496.
- Suresh, D.V.N.S., Baile, V. V., Prasada Rao, P.D., 2008. Annual reproductive phase-related profile of sex steroids and their carrier, SHBG, in the Indian major carp, *Labeo rohita*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159, 143–149. doi:10.1016/j.ygcen.2008.08.004
- Viayeh, R.M., Webb, M.A.H., Hallajian, A., Kazemi, R., Yali, M.P., 2006. Biochemical and morphometric parameters as indicators of sex and gonadal stages in maturing Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 364–368. doi:10.1111/j.1439-0426.2007.00986.x
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist*, 21, 325–343.

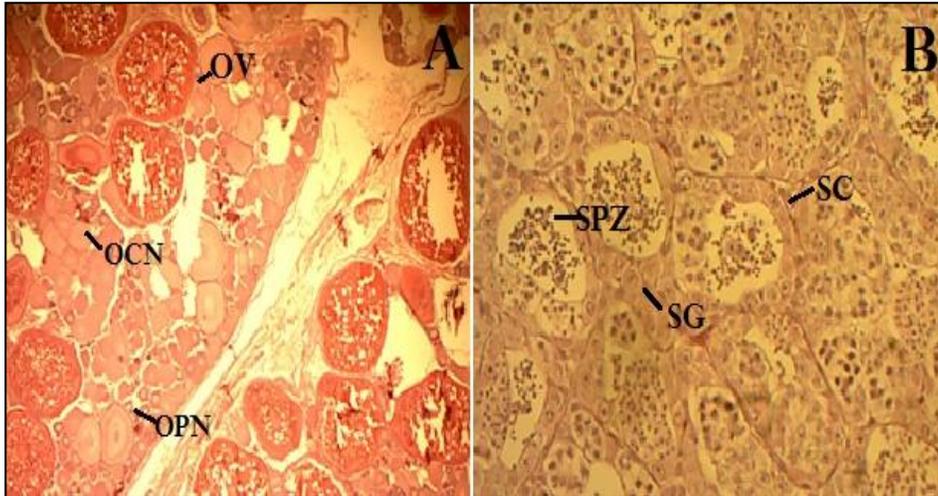
Legenda de Figuras

Fig. 1. Micrografias dos cortes histológicos de ovário (A) e testículo (B) em *A. ocellatus* com seis meses. Em A, a presença de lamelas ovígeras com ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (OCN, ovócitos cromatino-nucléolos; OPN, ovócitos perinucleares; OV, ovócitos vitelogênicos). Em B, os cistos espermáticos com presença de células espermáticas em diferentes fases de desenvolvimento (SG, espermatogônias; SC, espermatócitos e SZ, espermatozóides).

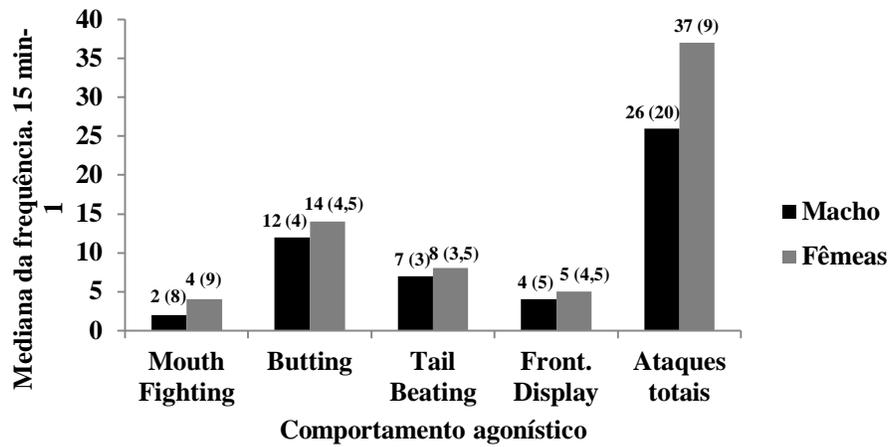


Fig. 2. Valores das medianas e respectivas distâncias interquartílicas para os ataques específicos e totais em *A. ocellatus* juvenis (n=48). Não houve diferença significativa durante o período de isolamento para o teste de Mann-whitney (“mouthing fighting” e “tail beating”) ou teste de t de student (“butting”, “frontal display” e ataques totais) ($p > 0,05$).

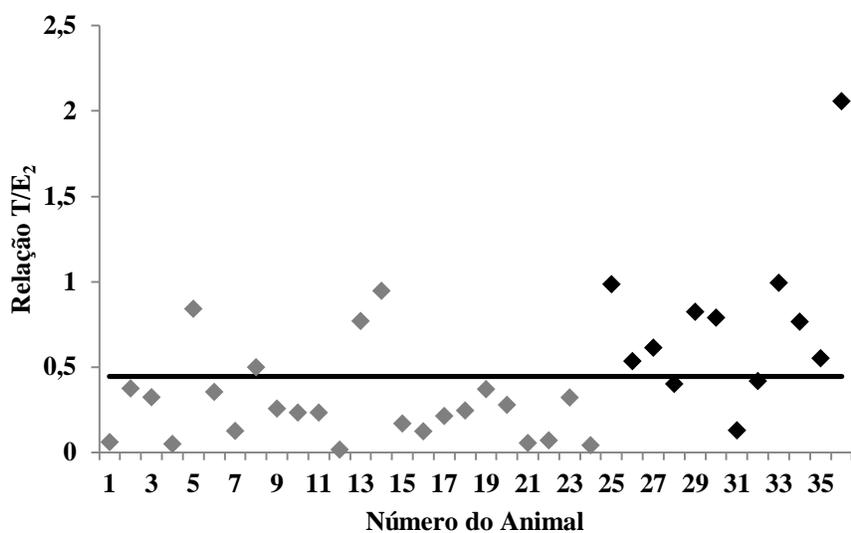


Fig. 3. Descriminação do sexo pela razão T/E_2 em juvenis de *A. ocellatus* ($n=36$). A linha indica o ponto de corte em função da média (0,45). Valores acima e abaixo dessa linha representam os animais sexados como machos e fêmeas, respectivamente. Os triângulos em cinza e preto representam, respectivamente, as fêmeas e machos sexados pela análise histológica das gônadas ($p=0,001$ e o índice=0,571).

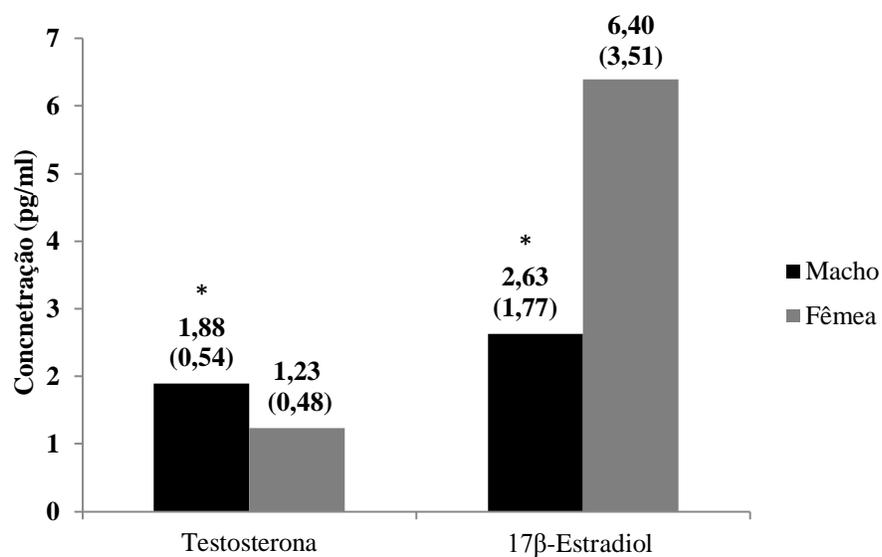


Fig. 4. Valores das medianas e respectivas distâncias interquartílicas para as concentrações dos hormônios esteróides sexuais em *A. ocellatus* juvenis (n=36). * indica diferença significativa entre machos e fêmeas no teste de Mann-whitney.

**ARTIGO 2 - CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE EXPRESSÃO DOS
GENES AUTOSSÔMICOS *Foxl2*, *Sox9* E *Wt1a* COMO GENES
CANDIDATOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM *Astronotus
ocellatus***

Artigo segue as normas e formato do periódico *Molecular Reproduction
and Development* ao qual será submetido

*Este artigo é um versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo

Caracterização e perfil de expressão dos genes autossômicos *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* como genes candidatos para a identificação do sexo em *Astronotus ocellatus*

Aline-Ferreira-Souza de CARVALHO^{1,2}; Isadora-Marques PAIVA³; José-Gilmar SOUZA¹; Ana-Paula PECONICK¹; Isabel-Vasquez BAANANTE⁴; Isidoro METÓN⁴; Luis-David-Solis MURGAS^{1*}

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Vale do Rio Verde (Unincor), Três Corações, Minas Gerais, Brasil

³ Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

⁴ Departamento de Bioquímica i Fisiologia, Secció de Bioquímica i Biologia molecular, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanha

***Correspondência:**

Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Lavras (UFLA)

Lavras, Minas Gerais, Brasil
e-mail: lsmurgas@dmv.ufla.br

Título curto: Caracterização e expressão de *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* em *A. ocellatus*

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível superior (CAPES), pelo apoio financeiro dado para execução da presente pesquisa. Os autores também agradecem as Universidade Federal de Lavras e Unniversitat de Barcelona pelo suporte oferecido para o desenvolvimento dos experimentos.

Resumo

O uso de marcadores moleculares apresenta-se como método eficaz para a identificação do sexo em peixes. Como possíveis marcadores do sexo, podem-se destacar os genes autossômicos relacionados à determinação e diferenciação sexual. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar os genes autossômicos *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* como possíveis candidatos para identificação do sexo em *Astronotus ocellatus*. Para isso, foi realizada a caracterização molecular e a determinação do perfil de expressão gênica dos genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* na gônada de machos e fêmeas. Para realização dos ensaios moleculares, foram coletados fragmentos de ovário (n=5) e testículos (n=5) de *A. ocellatus* adultos (435 ± 72 g e 26 ± 3 cm), após a eutanásia. Análise histológica dos fragmentos gonadais foi realizada para confirmação do sexo. Para caracterização molecular, extraiu-se o RNA total das gônadas e procedeu-se a síntese do cDNA.

Amostras de cDNA foram utilizadas para subsequente amplificação por PCR utilizando-se *primers* específicos para cada gene. Posteriormente, fragmentos de DNA amplificados por PCR foram purificados, clonados, seqüenciados e analisados filogeneticamente. Para determinar o perfil de expressão gênica nas gônadas de machos e fêmeas de *A. ocellatus* foram desenvolvidos ensaios de RT-qPCR. Como resultado, foi possível isolar e caracterizar sequências parciais de DNA dos genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* (n° de acesso ao GenBank: KT337395, KT337394 e KT337396, respectivamente). A análise filogenética revelou estreita relação entre as sequências de aminoácidos dos genes de interesse em *A. ocellatus* e outras espécies de peixes teleósteos. Os ensaios de RT-qPCR revelaram perfil de expressão gênica marcadamente influenciado pelo sexo para todos os genes de interesse. Assim, para o gene *Foxl2* níveis de RNAm foram significativamente maiores ($p=0.033$) no ovário em comparação ao testículo. Para os genes *Sox9* e *Wt1a* níveis de transcritos foram significativamente maiores ($p=0,020$ e $p=0,014$) nos testículo. Conclui-se que os genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* podem ser utilizados como marcadores moleculares para a identificação do sexo em *A. ocellatus*. Entretanto, é necessária a validação destes marcadores para a sexagem considerando tecidos extra-gonadais, tais como brânquias e nadadeiras.

Palavras-chaves: Clonagem molecular. Determinação sexual. Diferenciação sexual. Expressão gênica. Marcadores moleculares

Introdução

A identificação do sexo em peixes é questão de grande importância na aquicultura, principalmente no que diz respeito à reprodução em cativeiro. Por meio da sexagem adequada, é possível estabelecer o plantel de reprodutores com proporção adequada entre machos e fêmeas. Com isso, os gastos com a manutenção indevida de matrizes é reduzida, resultando no aumento da produção final de alevinos (Chu-Koo et al., 2009). Entretanto, em espécies que não apresentam dimorfismo sexual e cromossomos sexuais heteromórficos, a diferenciação entre os sexos é limitada, sendo necessário o uso de novas abordagens de sexagem.

Entre os diferentes métodos disponíveis para sexagem em peixes, o uso de marcadores moleculares é uma técnica de grande eficácia (Liu e Cordes, 2004; Xu e Zhu 2012; Liu et al., 2013). Como possíveis genes candidatos a marcadores do sexo pode-se destacar os genes autossômicos relacionados à determinação e diferenciação sexual (Martínez et al., 2013). Isto se deve ao fato destes genes serem diferencialmente expressos em função do sexo, sendo críticos para a formação testicular e/ou ovariana (Sandra e Norma, 2010).

Em peixes, a determinação e diferenciação sexual envolvem uma rede complexa de eventos moleculares associado a diferentes mecanismos genéticos e/ou ambientais (Devlin e Nagahama, 2002). Neste contexto, um grande número de trabalhos vem relatando a participação de genes autossômicos na determinação sexual em peixes, incluindo os genes *forkhead box 12 (Foxl2)* (Bhat et al., 2016a), *SRY-box 9 (Sox9)* (Bhat et al., 2016b) e *gene supressor de tumor de Wilm's (Wt1a)* (Chen et al., 2015).

O gene *Foxl2* é membro da família dos fatores de transcrição *forkhead* caracteriza pela presença do domínio conservado *forkhead box* de ligação ao DNA (Crisponi et al., 2001). Entre as funções de *Foxl2* na determinação e diferenciação sexual, a principal delas é a regulação da expressão do gene *Cyp19a1*, que codifica a aromatoase P450. Como consequência, *Foxl2*, por intermédio da regulação da expressão desta enzima esteroidogênica, exerce forte influência na diferenciação ovariana (Wang et al., 2008; Crespo et al., 2013; Liu et al., 2015). Além disso, *Foxl2* é também responsável por suprimir a diferenciação testicular através da repressão do gene *Sox9* (Uhlenhaut e Treier, 2006).

Já em relação aos genes *Sox9* e *Wtl1*, estes têm sido associados à diferenciação e desenvolvimento testicular. *Sox9* é membro do grupo E da família de genes SOX na qual possuem domínio de ligação ao DNA denominado HMG-box (Sinclair et al., 1990). Este gene codifica importante fator de transcrição *Sox9* que é considerado um dos principais responsáveis pela diferenciação gonadal em vertebrados (Kent et al., 1996; Kanai et al., 2005). Considerando a função exercida pelo *Sox9* na diferenciação testicular em peixes, tem sido preconizada sua regulação positiva sobre o gene *Amh* (Rodríguez-Marí et al., 2005). *Amh* é responsável pela regressão dos ductos de Muller que, em outra instância, se diferenciariam para formar as tubas uterinas e útero (Swain e Lovell-Badge, 1999). Desta maneira, *Sox9*, por meio da regulação da expressão de *Amh*, é fator chave para diferenciação testicular.

O gene *supressor do tumor de Wilm's (Wt1a)* codifica um importante fator de transcrição que exerce funções essenciais no desenvolvimento urogenital (Muruganankumar e Senthilkumar,

2016). Em peixes, *Wt1* participa da regulação transcricional de genes envolvidos na diferenciação testicular, tais como *Sfl* e *Gata 4* (Chen et al., 2015; Murugananthkumar e Senthilkumaran, 2016). Além disso, *Wt1* é também um importante regulador da esteroidogênese (Chen et al., 2014), incluindo a regulação negativa do gene *Cyp19a* (Drummond et al., 1998).

Para os três genes descritos, há estudos disponíveis indicando padrão de expressão com forte dimorfismo sexual em diferentes espécies de peixes, principalmente nas gônadas, embora sejam também detectados em outros tecidos (Rodríguez-Marí et al., 2005; Crespo et al., 2013; Murugananthkumar e Senthilkumaran, 2016). Além disso, embora sejam tipicamente expressos no momento da diferenciação sexual, níveis elevados de transcritos dos genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1* também são observados em animais adultos (Nakamoto et al., 2006; Caburet et al., 2012; Murugananthkumar e Senthilkumaran, 2016).

Astronotus ocellatus, é uma espécie de peixe nativo da América do Sul, sendo encontrada, originalmente, na bacia do rio Amazonas. Com crescente interesse, o oscar, como é conhecido popularmente, apresenta grande representatividade para aquarofilia, além de ser apreciado para consumo na região Norte e Nordeste do Brasil (Gurgel e Freitas, 1973). A identificação do sexo na espécie é limitada, uma vez que, está não apresenta dimorfismo sexual bem definido. De acordo com os dados disponíveis na literatura, não há estudos referentes ao uso de marcadores moleculares para a identificação do sexo. Além disso, há grande ausência de estudos referentes a esta espécie, especialmente no que diz respeito à biologia molecular.

Diante do exposto acima, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* como possíveis candidatos para identificação do sexo na espécie em questão. Para isso, objetivou-se, especificamente, a (1) caracterização molecular dos genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* e (2) determinar o perfil de expressão gênica destes genes na gônada de machos e fêmeas.

Resultados

Análises histológicas das gônadas

As análises histológicas das gônadas revelaram que dos 10 animais avaliados cinco deles eram fêmeas e cinco machos. Em relação ao estágio de desenvolvimento gonadal, todas as fêmeas encontravam-se em estágio III de desenvolvimento, ou seja, em maturação avançada, caracterizada pela presença de grande quantidade de ovócitos vitelogênicos. De maneira semelhante, os machos encontravam-se em estágio III de desenvolvimento, com presença de grande quantidade de espermatozóide no lúmen seminífero.

Caracterização molecular de fragmentos de DNA de *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* de *A. ocellatus*

Foxl2

Para o gene *Foxl2*, obteve-se um único fragmento parcial de DNA com comprimento de 252 pb (número de acesso ao GenBank: KT337395), com leitura de fase aberta (ORF) codificando uma sequência parcial de 80 aminoácidos deduzidos. A sequência de aminoácidos deduzida contém um domínio conservado de ligação de DNA *forkhead box* (FH) localizado entre os resíduos de aminoácidos 1 a 40. A análise filogenética revelou que a sequência de aminoácidos deduzida de *Foxl2* de *A. ocellatus* foi estreitamente relacionada com sequências de aminoácidos deduzidos de *Foxl2* de outros peixes ciclídeos (*O. niloticus*), seguido por *C. monoculus*, *O. latipes*, outras espécies peixes, em *X. laevis* e *G. galus* e, finalmente, mamíferos (Figura 1A).

Sox9

Para o gene *Sox9a*, obteve-se um único fragmento parcial de DNA com comprimento de 259 pb (número de acesso ao GenBank: KT337394), com ORF codificando uma sequência parcial de 86 aminoácidos deduzidos. Identificou-se a presença do domínio conservado HMG-box entre os resíduos de aminoácidos 57 e 86. A análise filogenética demonstrou que a sequência de aminoácidos deduzidas de *Sox9* está estreitamente relacionada a sequência de aminoácidos de *S. argus* (FIGURA 1B).

Wt1a

Para o gene *Wt1a*, obteve-se um único fragmento parcial de DNA com comprimento de 279 pb (número de acesso ao GenBank: KT337396), com ORF codificando sequência parcial de 93 aminoácidos. A sequência de aminoácidos deduzida de *Wt1a* contém o domínio conservado *WT1* nos resíduos 1 a 29. A análise filogenética revelou que a sequência de aminoácidos deduzida de *Wt1a* é agrupada mais próxima de sequências de *Wt1a* de outros peixes teleósteos.

Ensaio de RT-qPCR

Os ensaios de RT-qPCR revelaram a presença de um perfil de expressão gênica marcadamente influenciada pelo sexo para os genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* expressos nas gônadas de *A. ocellatus*. Para *Foxl2*, nível de expressão significativamente maior ($p = 0,033$) foi observado nas fêmeas em comparação aos machos, alcançando valores de RNAm três vezes mais elevado no ovário (FIGURA 2). Em contrapartida, perfil de expressão oposto foi encontrado para os genes *Sox9* e *Wt1a*, com nível de expressão significativamente maior ($p = 0,020$ e $p = 0,014$, respectivamente) em machos. Os níveis de RNAm para *Sox9* e *Wt1a* foram, respectivamente, 8 e 9 vezes mais elevados no testículo em comparação ao ovário (FIGURA 2).

Discussão

Caracterização molecular de fragmentos de DNA de *Foxl2*, *Sox9* e *Wtl*

No presente estudo, foi possível clonar e caracterizar sequências parciais de DNA de três diferentes genes de *A. ocellatus*, sendo estes *Foxl2*, *Sox9* e *Wtl1a*. Estes resultados são inéditos e podem contribuir para a identificação de marcadores moleculares a serem utilizados na identificação do sexo em peixes. Além disso, contribuem com bases genéticas e moleculares para estudos de determinação e diferenciação sexual.

Os genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wtl* já foram previamente caracterizados em diferentes espécies de peixes e suas funções têm sido associadas à determinação e diferenciação sexual (Rodríguez-Marí et al., 2005; Chen et al., 2015; Bhat et al., 2016b). As análises filogenéticas demonstraram que, para todos os três genes, as sequências de aminoácidos deduzidas de *A. ocellatus* são estreitamente relacionadas com sequências de outros peixes (FIGURA 1).

Em relação ao gene *Foxl2*, no presente estudo, identificou-se a presença do domínio conservado *forkhead box* na sequência de aminoácidos deduzidos. O *forkhead box* é um domínio de ligação ao DNA característico dos fatores de transcrição da família FOX (Crisponi et al., 2001). Sua sequência de aminoácido é altamente conservada entre as diferentes espécies de vertebrados sugerindo a função conservada desta região durante a evolução (Cocquet et al., 2002). De fato, o domínio FH corresponde a região mais conservada do gene, uma vez que, apresenta

identidade de nucleotídeos de cerca de 90% entre diferentes espécies de vertebrados (Loffler et al., 2003).

Estudos recentes têm identificado e caracterizado dois genes *Foxl2* parálogos coexistindo no genoma de peixes, sendo estes *Foxl2a* e *Foxl2b* (Baron et al., 2004; Crespo et al., 2013; Jiang et al., 2011). Ambos os genes codificam fatores de transcrição funcionais que podem reconhecer sítios de ligação de DNA semelhantes (Crespo et al., 2013). Quanto à função, a maior parte dos estudos indica a participação de *Foxl2a* na diferenciação ovariana (Dong et al., 2011). Para o gene *Foxl2b*, Baron et al. (2011) sugerem sua participação no início da meiose dos ovócitos e na regulação de genes específicos envolvidos no desenvolvimento e maturação final dos testículos.

No presente estudo, um único fragmento parcial de DNA de *Foxl2* foi isolado. Assim, devido à caracterização parcial, não foi possível estabelecer qual dos dois tipos está presente no genoma de *A. ocellatus*, denominando-o apenas como *Foxl2*. Entretanto, considerando o padrão de expressão observado nos ensaios de RTq-PCR, possivelmente, o fragmento de cDNA isolado seja correspondente ao gene *Foxl2a*, devido a presença de níveis maiores de RNAm no ovário, em comparação ao testículo (FIGURA 2).

Considerando o gene *Sox9*, na sequência de aminoácidos deduzidos foi identificado o domínio HMG-box. Os genes *Sox9* correspondem à família de fatores de transcrição com domínio HMG-box, sendo sua sequência de aminoácidos altamente conservada entre os diferentes vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis e peixes (Silva et al., 1996; Moreno-Mendonça et al., 1999).

Quanto à caracterização do gene *Sox9* em peixes, os resultados disponíveis na literatura indicam a presença de dois genes, sendo estes denominados de maneira diferentes em cada espécie. Por exemplo, em zebrafish (*Danio rerio*), bagre andador (*Clarias batrachus*), bagre africano (*Clarias gariepinus*), dois diferentes genes *Sox9* foram identificados, sendo estes denominados *Sox9a* (predominantemente expresso no testículo) e *Sox9b* (predominantemente expresso no ovário), ambos ortólogos ao gene *Sox9* de tetrápodes (Rodríguez-Marí et al., 2005; Raghuvver, e Senthilkumaran, 2010; Bhat et al., 2016b). Em contrapartida, em medaka (*Oryzias latipes*), inicialmente, havia sido identificado apenas um gene *Sox9a*, sendo este expresso apenas no ovário, indicando que *Sox9a* estava presente como uma cópia única no genoma (Yokoi et al., 2002). Posteriormente, identificou-se uma segunda cópia de *Sox9* (*Sox9a2*) no genoma desta espécie, sendo predominante expresso no testículo de animais adultos, sendo este denominado *Sox9a2* (Nakamoto et al., 2005), com padrão de expressão semelhante ao observado em zebrafish (*Danio rerio*) (Chiang et al., 2001).

Em *A. ocellatus*, um único fragmento de DNA de *Sox9* foi identificado e, com base no padrão de expressão (FIGURA 2), sugere-se que esta sequência seja referente ao tipo testicular, correspondente ao gene *Sox9a* na maioria das espécies de peixes estudados até o momento. Entretanto, considerando a codificação parcial deste gene, nomeou-se o gene apenas como *Sox9*.

Para o gene *Wt1*, em diferentes espécies de peixes, tais como carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Chen et al., 2015), medaka (*Oryzias latipes*) (Klüver et al., 2009), zebrafish (*Danio rerio*) (Bollig et al., 2006),

dois genes *Wt1* (*Wt1a* e *Wt1b*) foram identificados. Quanto à função dos genes *Wt1*, em medaka (*Oryzia latipes*), estes demonstraram ser co-ortólogos, com evidências de redundância funcional na manutenção e sobrevivência de células germinativas primordiais (Klüver et al., 2009). Em contrapartida em zebrafish (*Danio rerio*), embora as proteínas codificadas por *Wt1a* e *Wt1b* apresentem identidade superior a 90%, funções diferentes e não redundantes no desenvolvimento gonadal têm sido propostas (Bollig et al., 2006). Para *A. ocellatus*, um único fragmento de *Wt1* foi isolado, sendo este correspondente ao gene *Wt1a*. Os ensaios subsequentes de RT-qPCR indicam seu efeito no desenvolvimento testicular (Fig. 2), como descrito mais adiante.

Ensaio de RT-qPCR

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de RT-qPCR demonstraram um padrão de dimorfismo sexual na expressão de todos os genes avaliados. Pela primeira vez, de acordo com o nosso conhecimento, foram estabelecidos os perfis de expressão de *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* nas gônadas de *A. ocellatus*. Portanto, dado o perfil de dimorfismo sexual para estes genes, pode-se inferir que estes sejam bons candidatos para a identificação do sexo nesta espécie.

No presente estudo, níveis elevados de RNAm de *Foxl2* foram detectados nos ovários em comparação aos testículos. Tal padrão de expressão também foi observado para outras espécies de peixes. Em robalo (*Dicentrarchus labrax*), o padrão de expressão gonadal de *Foxl2* também apresentou forte dimorfismo sexual, com níveis elevados de

RNA_m de *Foxl2* no ovário. Em contrapartida, a expressão relativa de *Foxl2* no testículo permaneceu baixa ao longo de todo o ciclo reprodutivo (Crespo et al., 2013). De maneira semelhante, em bagre andador (*Clarias batrachus*), *Foxl2* foi altamente expresso no ovário, enquanto níveis moderados foram detectados no testículo (Bhat et al., 2016b).

Corroborando com estes resultados, em peixe carvão (*Anoplopoma fimbria*) (Smith et al., 2013), *Gobiocypris rarus* (Jiang et al., 2011), linguado (*Paralichthys olivaceus*) (Si et al., 2016), tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Wang et al., 2008), medaka (*Oryzias latipes*) (Nakamoto et al., 2006), padrão de expressão semelhante foi observado. Assim, os resultados disponíveis na literatura reforçam a fundamental participação de *Foxl2* na diferenciação ovariana em peixes (Liu et al., 2015).

A expressão de *Foxl2* em fêmeas de *A. ocellatus*, embora tenha diferido em relação aos machos, apresentou níveis relativamente baixos de RNA_m no ovário. No presente estudo, todos os animais, incluindo machos e fêmeas, encontravam-se em estágio avançado de desenvolvimento gonadal, o que pode ter contribuído, pelo menos em parte, para o perfil de expressão observado. Este resultado pode estar associado ao fato de que, como evidenciado em outras espécies (*Scatophagus argus*, *Oryzias latipes* e *Anoplopoma fimbria*), os níveis ovarianos de *Foxl2* são maiores nos estágios iniciais de desenvolvimento gonadal, diminuindo com o avanço da gametogênese (Nakamoto et al., 2006; Smith et al., 2013; Liu et al., 2015).

Liu e colaboradores (2015) ressaltam que maior expressão de *Foxl2* no início do desenvolvimento gonadal pode estar associada ao seu

papel na diferenciação das células da granulosa e formação da membrana dos folículos. Em machos, níveis reduzidos de *Foxl2* permaneceram baixo ao longo de todo o ciclo reprodutivo, o que condiz com o fato de *Foxl2* não ter participação direta no desenvolvimento testicular (Schalburg et al., 2011; Crespo et al., 2013).

Contradizendo os resultados expostos acima, outros estudos têm relatado a presença de níveis elevados de *Foxl2* em estágios tardios de desenvolvimento gonadal (Crespo et al., 2013; Si et al., 2016). Em robalo (*Dicentrarchus labrax*), aumento nos níveis de *Foxl2* foi observado durante as fases tardias de vitelogênese e maturação final, quando a expressão da enzima esteroidogênica StAR e da aromatase P450 está elevada. A enzima StAR e aromatase P450 estão envolvidas no transporte de colesterol para a membrana interna da mitocôndria e na conversão de andrógenos em estrógenos, respectivamente (Stocco e Clark, 1996). Assim, para esta espécie, foi sugerido que *Foxl2* esteja envolvido na regulação da esteroidogênese, crescimento e maturação ovariana (Crespo et al., 2013).

Considerando as diferenças encontradas na literatura, é importante ressaltar que, além de ser marcadamente influenciado pelo sexo, o padrão de expressão de *Foxl2* nas gônadas de peixes é dependente do estágio de desenvolvimento, o que pode variar consideravelmente dependendo da espécie em questão (Liu et al., 2015; Si et al., 2016). Em *A. ocellatus*, de acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que, provavelmente, *Foxl2* exerça maior atividade nos estágios iniciais de desenvolvimento gonadal, haja vista o baixo nível de transcritos em fases de maturação avançada.

Para os genes *Sox9a* e *Wt1a*, maiores níveis de RNAm foram observados em *A. ocellatus* machos em comparação as fêmeas. Estes resultados vão de encontro ao observado na literatura para outras espécies de peixes (Rodríguez-Marí et al., 2005; Luo et al., 2010; Bhat et al., 2016b), o que reflete a função destes genes. Ambos *Sox9* e *Wt1* têm sido previamente relatados como fatores de transcrição importantes na regulação da determinação e diferenciação sexual em machos (Vidal et al., 2001; Bhat et al., 2016b).

Em peixes, a participação do fator de transcrição *Sox9* nos processos de determinação e diferenciação sexual não é tão clara como observado em mamíferos. Isto se deve ao fato de que, dependendo da espécie, o perfil de expressão gênica pode variar consideravelmente e, conseqüentemente, afeta a função exercida por ele. Por exemplo, em medaka (*Oryzias latipes*) (Nakamoto et al., 2005), peixe carvão (*Anoplopoma fimbria*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Ijiri et al., 2008; Luo et al., 2010) *Sox9* não exerce papel fundamental na diferenciação sexual, haja vista semelhança na expressão entre os sexos durante a diferenciação sexual. Não obstante a isso, em zebrafish (*Danio rerio*) (Rodríguez-Marí et al., 2005), bagre andador (*Clarias batrachus*) (Bhat et al., 2016b) e bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Raghuv eer e Senthilkumaran, 2010) *Sox9a* está envolvido em diferentes vias de sinalização subjacentes à determinação e diferenciação sexual (Luo et al., 2010).

Níveis extremamente elevados de transcritos de *Sox9* foram detectados nos testículos de *A. ocellatus* adultos, o que está de acordo com dados disponíveis na literatura para outras espécies de peixes. Por

exemplo, em zebrafish (*Danio rerio*), níveis elevados de *Sox9a* são detectados em gônadas indiferenciadas, mas também em testículos de animais juvenis e adultos (Rodríguez-Marí et al., 2005). De maneira semelhante, em bagre andador (*Clarias batrachus*), *Sox9a* foi altamente expresso em gônadas desenvolvidas, principalmente nas fases preparatórias e pré-desova do ciclo reprodutivo (Bhat et al., 2016b).

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se inferir que para *A. ocellatus* *Sox9a* representa um fator chave na regulação da função testicular, devido ao elevado nível de transcritos de *Sox9a* no testículo. Entre os possíveis papéis de *Sox9a* na função testicular pode-se destacar: regulação positiva do gene *Amh* (Rodríguez-Marí et al., 2005), desenvolvimento de estruturas tubulares no testículo, após a diferenciação gonadal (Nakamoto et al., 2005), proliferação de células germinativas primordiais em testículo e ovário (Ijiri et al., 2008) e diferenciação e manutenção de células de Sertoli (Luo et al., 2010).

Em relação ao gene *Wt1a*, os estudos disponíveis na literatura vão de encontro ao observado para *A. ocellatus*, sendo *Wt1a* diferencialmente expresso em relação ao sexo também em outras espécies. Por exemplo, em bagre andador (*Clarias batrachus*), maior expressão de *Wt1* foi detectado no testículo em desenvolvimento, quando comparado ao ovário (Muruganankumar e Senthilkumaran, 2016). De maneira semelhante, em carpa comum (*Cyprinus carpio*), maior expressão de *Wt1* também foi detectada no testículo, sendo possivelmente associada à diferenciação testicular (Chen et al., 2015).

Níveis extremamente elevados de transcritos de *Wt1a* foram observados nos testículos de *A. ocellatus* adultos. Este achado é

condizente com o encontrado para outras espécies e está diretamente relacionado ao estágio de maturação gonadal avançado. Por exemplo, em bagre andador (*Clarias batrachus*), além de níveis elevados de *Wt1* durante a ontogênese testicular, expressão significativa de *Wt1* também foi observada em testículos de animais adultos, estando diretamente correlacionada a fase do ciclo reprodutivo. Nesta espécie, maior expressão de *Wt1* foi detectada nas fases de pré-desova e desova, o que indica a participação deste gene durante a espermatogênese ativa (Muruganankumar e Senthilkumaran, 2016). Assim, o nível elevado de *Wt1a* no testículo de *A. ocellatus* pode ser explicado, em parte, pelo estágio avançado de maturação gonadal dos animais.

Os resultados para *Wt1a* indicam que este seja um importante fator na regulação da função testicular em *A. ocellatus* adultos. Entre as funções conhecidas de *Wt1a* na diferenciação e desenvolvimento gonadal pode-se destacar participação na espermatogênese (Muruganankumar e Senthilkumaran, 2016), suporte as células de Sertoli (Klattig et al., 2007), manutenção e sobrevivência de células germinativas primordiais (Klüver et al., 2009), regulação de rede transcricional de genes envolvidos na diferenciação sexual (Klüver et al., 2009) e regulação da esteroidogênese gonadal (Chen et al., 2014).

No presente estudo, as análises de expressão gênica de *Foxl2*, *Sox9a* e *Wt1a* foram restritas aos tecidos previamente conhecidos por serem os principais sítios de expressão destes genes, sendo estes, testículo e ovário (Rodríguez-Marí et al., 2005; Crespo et al., 2013; Muruganankumar e Senthilkumaran, 2016). Entretanto, seria interessante, em uma investigação futura, avaliar a expressão destes genes

em tecidos extra-gonadais, uma vez que, para outras espécies de peixes foi evidenciada a presença de transcritos em diferentes tecidos (Crespo et al., 2013; Smith et al., 2013; Chen et al., 2015; Bhat et al., 2016a). Esta abordagem seria interessante, por exemplo, a fim de estabelecer marcadores moleculares para identificação do sexo em tecidos que apresentem maior facilidade para coleta, tais como, nadadeiras e brânquias. Além disso, seria notória a avaliação da expressão diferencial destes genes ao longo do curso da determinação e diferenciação sexual e também durante diferentes estágios de desenvolvimento gonadal.

Em síntese, conclui-se que os genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* podem ser utilizados como marcadores moleculares para a identificação do sexo em *A. ocellatus*, haja vista o forte dimorfismo sexual para todos os genes. Entretanto, investigações futuras são necessárias a fim de validar o uso destes marcadores em outros tecidos. Em conjunto, os resultados obtidos contribuem para a identificação do sexo em *A. ocellatus* e fornece *insights* sobre os mecanismos moleculares envolvidos na determinação e diferenciação do sexo. Além disso, fornecem informações científicas valiosas para o norteamento de novas pesquisas.

Material e métodos

Animais e amostragem dos tecidos

Os animais utilizados neste estudo foram obtidos do Laboratório Multiusuário – Biotério de Animais da Universidade Federal de Lavras (Lavras, Minas Gerais, Brasil). Previamente a realização dos ensaios, *A. ocellatus* adultos, com peso e comprimento médio de 435 ± 72 g e 26 ± 3

cm, respectivamente, foram mantidos, individualmente, em aquários de 40 L sob sistema de recirculação, por um período de, aproximadamente, 12 meses. O fotoperíodo manteve-se em 12 h de luz e 12 h de escuro. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, às 8 h e 16 h, com ração comercial extrusada (Fri-Aqua juvenil®) contendo 32% de proteína bruta em pelets de, aproximadamente, dois milímetros de diâmetro, *ad libitum*.

Após período de 24 h de jejum, um total de 10 animais foram selecionados, anestesiados com eugenol (250 mg/L de água) e eutanasiados por meio de secção medular. Após abertura da cavidade celomática, fragmentos de gônadas foram dissecados, sendo estes rapidamente congelados em nitrogênio líquido a -196 °C e armazenados a -80 °C até realização dos ensaios moleculares. Adicionalmente, pequeno fragmento da gônada de cada peixe foi fixado em solução de Bouin para determinação do sexo e estágio de desenvolvimento gonadal por meio de análises histológicas, conforme descrito adiante. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais, sob registro do protocolo 052/2013. As análises moleculares subsequentes foram realizadas no Departament de Bioquímica i Biologia Molecular da Facultat de Farmàcia da Universitat de Barcelona.

Análises histológicas das gônadas

As amostras de gônadas foram processadas por técnicas histológicas rotineiras e as lâminas coradas por hematoxilina-eosina. As lâminas foram então analisadas sob microscopia óptica de campo claro com objetiva de 40X e o sexo identificado de acordo com as

características histológicas do ovário e testículos. O estágio de desenvolvimento gonadal e a maturidade sexual dos animais foram determinados com base nas características morfológicas do ovário e testículo (Wallace e Selman, 1981; Godinho et al., 2005).

Extração do RNA e síntese de cDNA

Em um primeiro momento, RNA total foi extraído a partir de amostras congeladas de ovário (n = 5) e testículo (n = 5) por meio do kit comercial SV Total RNA Isolation (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total obtido foi então quantificado utilizando-se o NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Em seguida, procedeu-se com as reações de transcriptase reversa (RT-PCR) para obtenção de moldes de cDNA fita única utilizando-se o kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System kit (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante, utilizando-se primers randomizados. O cDNA obtido, para cada amostra de tecido, foi utilizado para posteriores ensaios de clonagem molecular e PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Análise *in silico*

Iniciadores (*forward e reverse*) específicos para cada gene foram desenhados com base em regiões conservadas de sequências de

nucleotídeos dos genes *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1*, de diferentes espécies de peixes e outros vertebrados, depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências genômicas utilizadas para alinhamento estão representadas na Tabela 1. Para a seleção das regiões conservadas, tais sequências foram alinhadas com auxílio da ferramenta online EMBL-EBI ClustalW2 – Multiple Sequence Alignment Tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Em seguida, os iniciadores foram avaliados quanto as suas características com auxílio do programa OligoAnalyser. Além disso, os iniciadores foram verificados quanto a sua especificidade, comparando-os, por meio do programa BLAST, com o banco de dados depositados no NCBI. O par de iniciadores, tamanho dos *amplicons* obtido por PCR, para cada um dos genes de interesse, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1

Par de iniciadores, tamanho dos *amplicons* obtidos por PCR e sequências alinhadas para o desenho dos iniciadores

Gene	Iniciador	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Sequências alinhadas (acesso a GeneBank)
<i>Foxl2</i>	Forward	GGTTGGCAGAACAGCATCAG	259	<i>Sebastes schlegelii</i> (JN998083); <i>Danio rerio</i> (NM_001045252); <i>Oreochromis niloticus</i> (NM_001279778); <i>Dicentrarchus labrax</i> (KF208536); <i>Gobiocypris rarus</i> (JN200819); <i>Epinephelus merra</i> (EU555180); <i>Homo sapiens</i> (NM_023067); <i>Xenopus laevis</i> (AB372218); <i>Gallus gallus</i> (JF708868)
	Reverse	CCAGGAGTTGTTTCATAAAGC		
<i>Sox9</i>	Forward	GGTTCGGACACTGAGAACAC	242	<i>Danio rerio</i> (NM_131643); <i>Epinephelus akaara</i> (AY676309); <i>Scatophagus argus</i> (JQ740598); <i>Oncorhynchus mykiss</i>
	Reverse	CCCAGGGTTTTGCTGAGTTC		

			(AB006448); <i>Epinephelus coioides</i> (GQ232762); <i>Homo sapiens</i> (Z46629); <i>Gallus gallus</i> (AB012236.1)
<i>Wt1</i>	<i>Forward</i>	CAGTACCGCATCCACACA	<i>Oryzias latipes</i> (AB070576.1); <i>Danio rerio</i> (NM_001039634.2); <i>Salmo salar</i> (NM_001173778.1); <i>Epinephelus coioides</i> (JX564599.1); <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NM_001124295.1)
	<i>Reverse</i>	AACTTTCTCTGACACGTCTC	

Reações em cadeia pela polimerase (PCR)

As amostra de cDNA, previamente obtidas, foram utilizadas como molde para amplificação por PCR, utilizando-se pares de iniciadores específicos para cada gene (TABELA 1). Assim, de acordo com o gene de interesse, foram utilizados *pools* de cDNA do ovário (*Foxl2*) ou do testículo (*Sox9* e *Wt1*). A reação de PCR, para cada um dos genes, constituiu-se de tampão de PCR 1X, 2mM de MgCl₂; 200μM de dNTP's; 4μg de cDNA molde; 0,5 μl de Taq DNA Polimerase (1000U) e 0,2μM dos iniciadores *forward* e *reverse*. As condições de PCR incluíram: um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 min; seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 seg; anelamento de 55°C por 30 seg e extensão a 72 °C por 100 seg, seguido por extensão final de 1 min a 72°C. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com Gel Red™ 1X, em cuba de eletroforese horizontal, utilizando-se TBE como tampão de corrida. Com auxílio de padrão de peso molecular, foram identificadas as respectivas bandas de interesse.

Purificação dos fragmentos de DNA e clonagem

Os fragmentos de DNA de *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* amplificados por PCR, foram purificados, a partir do gel de agarose, por meio do kit comercial High Pure PCR Product Purification kit (Roche) e quantificados em NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Em seguida, procedeu-se a ligação dos fragmentos no vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector (Promega), utilizando-se T4 DNA ligase, durante 1 h em temperatura ambiente, sendo em seguida mantida a 4°C *overnight*. A transformação foi realizada por meio de choque térmico, utilizando células *E. coli* competentes (XL1-Blue).

Posteriormente, alíquotas de 100 a 200 µL de cada reação de transformação da clonagem foram semeadas em placas com meio LB-agar contendo ampicilina (50 µg/ml), sendo incubadas durante a noite a 37 °C. Para análise dos transformantes, foram selecionadas 20 colônias do crescimento bacteriano. Amostras das colônias, individualmente, foram retiradas das placas e depositadas em tubos de PCR para realização da PCR de colônia, utilizando-se os mesmos iniciadores apresentados anteriormente (TABELA 1). Colônias positivas foram então selecionadas e cultivadas em 3 ml de LB líquido com ampicilina, em estufa a 37 °C com rotação de 200 rpm por um período de 24 horas.

A extração e isolamento do DNA plasmidial do cultivo bacteriano foi realizada por meio do kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA plasmidial obtido foi então quantificado em NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Para confirmar as amostras positivas para o vetor com o

inserto desejado, uma nova PCR foi realizada utilizando-se o DNA plasmidial obtido na purificação.

Sequenciamento

Para sequenciamento, três clones independentes, para cada produto amplificado, foram sequenciados, utilizando-se o iniciador universal T7. Em casos em que apenas dois clones foram verificados quanto à presença do inserto ou em casos de ambiguidade da direção de clonagem, novos clones foram sequenciados na direção oposta, utilizando o iniciador universal SP6. As sequências de cDNA obtidas foram utilizadas para desenho dos iniciadores utilizados nos ensaios RT-qPCR.

Análise das sequências e análise filogenética

As sequências de nucleotídeos de cada fragmento de DNA foram traduzidas em sequências de aminoácidos utilizando-se programa de tradução (<http://web.expasy.org/translate>), a fim de identificar a fase de leitura aberta. Após identificação da fase de leitura aberta, as sequências de aminoácidos deduzidas dos genes de interesse foram verificadas utilizando o programa BLAST do NCBI (<http://web.expasy.org/translate>). Alinhamentos múltiplos entre as sequências de aminoácidos deduzidas de *A. ocellatus* e sequências de outras espécies (obtidas no banco de dados do NCBI) foram realizadas utilizando o programa Clustalw2. Árvores filogenéticas foram geradas utilizando o método neighbor-joining. Os gaps foram removidos e as distâncias corrigidas. Para realização das análises filogenéticas foram

selecionadas diferentes espécies de peixes teleósteos e outras classes de vertebrados (mamíferos e aves), de acordo com a disponibilidade das sequências no GeneBank.

Ensaio de RT-qPCR

Ensaio de RT-qPCR foram desenvolvidos a fim de avaliar possíveis diferenças no perfil de expressão gênica de *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* em gônadas. Para isso, foram utilizadas amostras de cDNA obtidas por RT-PCR, como descrito na seção 2.3. Para realização da RT-qPCR, iniciadores específicos (*forward* e *reverse*) para cada gene foram desenhados utilizando-se o programa OligoFactorySE (TABELA 2). Para avaliar a linearidade e eficiência dos iniciadores, curvas padrões com diluições seriadas (1:1, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40) do cDNA foram determinadas. Os níveis de RNAm de *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a*, foram determinados em StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), sendo a reação constituída de 1X Power SYBR®Green (Applied Biosystems®), 0.5 ng do cDNA e 0.4 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*).

O nível de RNAm para os genes de interesse em cada amostra foi normalizado considerando o nível de expressão de dois genes de referência, β -actina (*β -actina*) e fator de alongamento 1 alfa (*Ef1 α*) (TABELA 2). O tamanho dos amplicons para *β -actina*, *Ef1 α* , *Foxl2*, *Sox9*

e *Wt1a* foi rotineiramente controlado por eletroforese em gel de agarose. Para cada amostra, a PCR foi realizada em duplicata e a variação na expressão gênica foi calculada pelo método padrão de $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001). Assim, para o cálculo $\Delta\Delta Ct$ considerou-se a média geométrica dos Ct dos genes de referência (*β -actina* e *Efl α*). Os dados obtidos foram confirmados em pelo menos dois ensaios independentes de RT-qPCR.

Tabela 2

Iniciadores utilizados na qRT-PCR e tamanho dos amplicons

Gene	Iniciadores	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
Genes de referência			
<i>B-actina</i>	<i>Forward</i>	AGGATGCAGAAGGAAATCACAGC	124
	<i>Reverse</i>	GGAAGGTGGACAGAGAGGC	
<i>Eflα</i>	<i>Forward</i>	GCTGGTTCAAGGGATGGAAGA	114
	<i>Reverse</i>	GGAGGGGCTTGTTCAGTGG	
Genes de interesse			
<i>Foxl2</i>	<i>Forward</i>	GGCGGGGAGAGAAAGGGAAA	123
	<i>Reverse</i>	GAAGTGCCTTGGTGGGGG	
<i>Sox9</i>	<i>Forward</i>	AGGTGTTGAAGGGTTATGACTGGA	161
	<i>Reverse</i>	GTTGTGCAGATGTGGGTATTG	
<i>Wt1a</i>	<i>Forward</i>	TCAGGGGAATACAGGATGTGCGG	185
	<i>Reverse</i>	GAACTCACACTGGTAGGG	

Análises estatísticas

A normalidade dos resíduos dos dados referentes à expressão dos genes candidatos foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk, em seguida aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a diferença entre os sexos quanto ao perfil de expressão. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Diferenças com

$P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Para as análises estatísticas foi utilizado o software R 3.2.2.

Referências

- Baron D, Cocquet J, Xia X, Fellous M, Guiguen Y, Veitia RA: An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *J Mol Endocrinol* 2004;33:705–715.
- Bhat IA, Rather MA, Dar JY, Sharma R: Molecular cloning, computational analysis and expression pattern of forkhead box l2 (Foxl2) gene in catfish. *Comput Biol Chem* 2016a;64:9–18.
- Bhat IA, Rather MA, Saha R, Pathakota GB, Pavan-Kumar A, Sharma R: Expression analysis of Sox9 genes during annual reproductive cycles in gonads and after nanodelivery of LHRH in *Clarias batrachus*. *Res Vet Sci* 2016b;106:100–106.
- Bollig F, Mehringer R, Perner B, Hartung C, Schäfer M, Scharl M, et al.: Identification and comparative expression analysis of a second wt1 gene in zebrafish. *Dev Dyn* 2006;235:554–561.
- Caburet S, Georges A, L'Hôte D, Todeschini AL, Benayoun BA, Veitia RA: The transcription factor FOXL2: At the crossroads of ovarian physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol* 2012;356:55–64.
- Chen JJ, Xia XH, Wang LF, Jia Y fang, Nan P, Li L, et al.: Identification and comparison of gonadal transcripts of testis and ovary of adult common carp *Cyprinus carpio* using suppression subtractive hybridization. *Theriogenology* 2015;83:1416–1427.
- Chen M, Wang X, Wang Y, Zhang L, Xu B, Lv L, et al.: Wt1 Is Involved in Leydig Cell Steroid Hormone Biosynthesis by Regulating Paracrine Factors Expression in Mice. *Biol Reprod* 2014;90:1–9.
- Chiang EF, Pai CI, Wyatt M, Yan YL, Postlethwait J, Chung B: Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol* 2001;231:149–63.
- Chu-Koo, F. *et al.* Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry* 2009; 35:125–136.
- Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, Servel N, Xia X, Pannetier M, et al.:

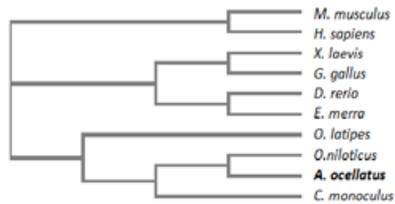
- Evolution and expression of FOXL2 2002;
- Crespo B, Lan-Chow-Wing O, Rocha A, Zanuy S, Gómez A: Foxl2 and foxl3 are two ancient paralogs that remain fully functional in teleosts. *Gen Comp Endocrinol* 2013;194:81–93.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, et al.: The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis / ptosis / epicanthus inversus syndrome. *Nature* 2001;27:159–166.
- Devlin RH, Nagahama Y: Sex determination and sex differentiation in fish : an overview of genetic , physiological , and environmental influences. *Aquaculture* 2002;208:191–364.
- Drummond I a, Majumdar a, Hentschel H, Elger M, Solnica-Krezel L, Schier a F, et al.: Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* 1998;125:4655–67.
- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, et al.: Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod* 2008;78:333–341.
- Jiang W, Yang Y, Zhao D, Liu X, Duan J, Xie S, et al.: Effects of sexual steroids on the expression of foxl2 in *Gobiocypris rarus*. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* 2011;160:187–193.
- Kanai Y, Hiramatsu R, Matoba S, Kidokoro T: From SRY to SOX9: Mammalian testis differentiation. *J Biochem* 2005;138:13–19.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair a H, Koopman P: A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 1996;122:2813–2822.
- Klüver N, Herpin A, Braasch I, Drießle J, Schartl M: Regulatory back-up circuit of medaka *Wt1* co-orthologs ensures PGC maintenance. *Dev Biol* 2009;325:179–188.
- Liu F, Sun F, Li J, Xia JH, Lin G, Tu RJ, et al.: A microsatellite-based linkage map of salt tolerant tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis spp.*) and mapping of sex-determining loci. *BMC Genomics* 2013;14:58.
- Liu ZJ, Cordes JF: DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 2004;238:1–37.
- Liu H, Mu X, Gui L, Su M, Li H, Zhang G, et al.: Characterization and gonadal expression of FOXL2 relative to *Cyp19a* genes in spotted

- scat *Scatophagus argus*. *Gene* 2015;561:6–14.
- Loffler KA, Zarkower D, Koopman P: Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* 2003;144:3237–3243.
- Luo Y-S, Hu W, Liu X-C, Lin H-R, Zhu Z-Y: Molecular cloning and mRNA expression pattern of Sox9 during sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture* 2010;306:322–328.
- Muruganankumar R, Senthilkumaran B: Expression analysis and localization of wt1, ad4bp/sf-1 and gata4 in the testis of catfish, *Clarias batrachus*: Impact of wt1-esiRNA silencing. *Mol Cell Endocrinol* 2016;431:164–176.
- Nakamoto M, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N: Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:729–736.
- Nakamoto M, Matsuda M, Wang DS, Nagahama Y, Shibata N: Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:353–361.
- Raghuveer K, Senthilkumaran B: Isolation of sox9 duplicates in catfish: Localization, differential expression pattern during gonadal development and recrudescence, and hCG-induced up-regulation of sox9 in testicular slices. *Reproduction* 2010;140:477–487.
- Rodríguez-Marí A, Yan YL, 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 Expr Patterns* 2005;5:655–667.
- Sandra GE, Norma MM: Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fish* 2010;20:101–121.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al.: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [Internet]. *Nature* 1990 Jul 19;346:240–244.
- Si Y, Ding Y, He F, Wen H, Li J, Zhao J, et al.: DNA methylation level of cyp19a1a and Foxl2 gene related to their expression patterns and reproduction traits during ovary development stages of Japanese

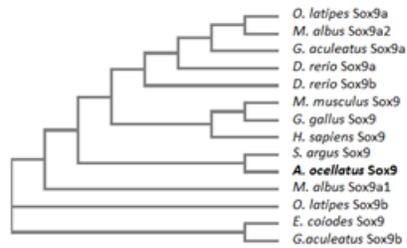
- flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gene* 2016;575:321–330.
- Smith EK, Guzmán JM, Luckenbach JA: Comparative Biochemistry and Physiology, Part B Molecular cloning, characterization, and sexually dimorphic expression of five major sex differentiation-related genes in a Scorpaeniform fish, sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Comp Biochem Physiol Part B* 2013;165:125–137.
- Uhlenhaut NH, Treier M: Foxl2 function in ovarian development. *Mol Genet Metab* 2006;88:225–234.
- Vidal VP, Chaboissier MC, Rooij D de, Schedl A, de Rooij DG, Schedl A: Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 2001;28:216–7.
- von Schalburg KR, Yasuike M, Yazawa R, de Boer JG, Reid L, So S, et al.: Regulation and expression of sexual differentiation factors in embryonic and extragonadal tissues of Atlantic salmon. *BMC Genomics* 2011;12:31.
- Xu HM, Zhu J: Statistical approaches in QTL mapping and molecular breeding for complex traits. *Chinese Sci Bull* 2012;57:1–8.
- Wang Q, Hong W, Chen S, Zhang Q: Variation with semilunar periodicity of plasma steroid hormone production in the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*. *Gen Comp Endocrinol* 2008;155:821–826.
- Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, Nagahama Y, Wakamatsu Y, Takeda H, et al.: Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Mol Reprod Dev* 2002;63:5–16.

Legendas de Figuras

A) *Foxl2*



B) *Sox9*



C) *Wt1*

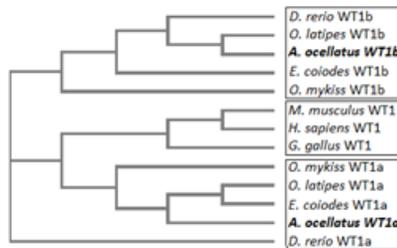


Figura 1. Porcentagem de identidade da sequência parcial de aminoácidos deduzida de *Foxl2* de *A. ocellatus* com outras espécies e análise filogenética da sequência de *Foxl2* (A), porcentagem de identidade da sequência parcial de aminoácidos deduzida de *Sox9* de *A. ocellatus* com outras espécies e análise filogenética da sequência de *Sox9* (B) e porcentagem de identidade da sequência parcial de aminoácidos deduzida de *Wt1* de *A. ocellatus* com outras espécies e análise filogenética da sequência de *Wt1* (C).

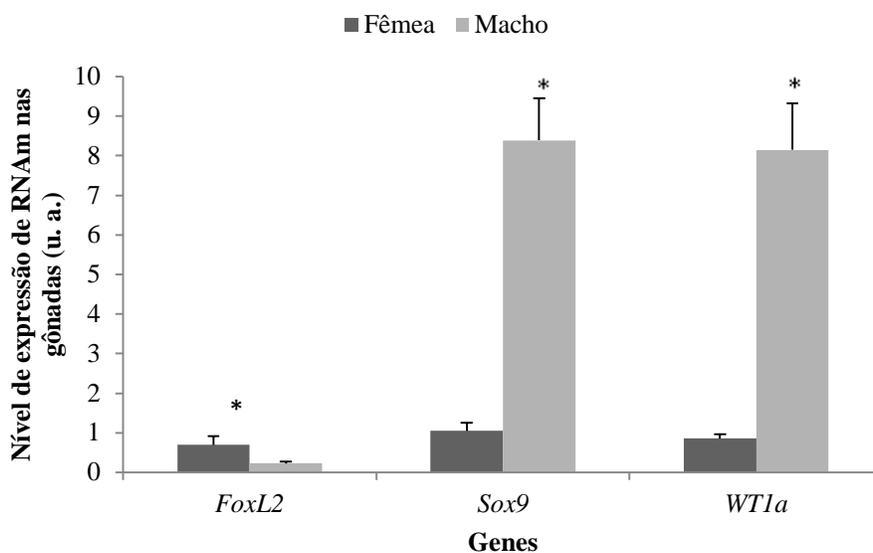


Figura 2, Perfil de expressão de *Foxl2*, *Sox9* e *Wt1a* em gônadas de *A. ocellatus* adultos de acordo com o sexo. O nível de expressão para cada gene foi normalizado utilizando os genes de referência β -actina e *efl1a* (método padrão de $\Delta\Delta Ct$, considerando a média geométrica dos valores de Ct dos genes de referência). Os resultados são apresentados como média e erro padrão da média (n = 5 por grupo). u. a.: unidades arbitrária. Asteriscos significam diferenças significativas entre os grupos, para cada gene ($p < 0,05$).