

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Análise do polimorfismo nos genes CYP19a e CYP19b em
Oreochromis niloticus da linhagem Supreme e suas
relações com caracteres reprodutivos**

Marília Danyelle Nunes

Pelotas, 2011

MARÍLIA DANYELLE NUNES

**Análise do polimorfismo nos genes CYP19a e CYP19b em
Oreochromis niloticus da linhagem Supreme e suas
relações com caracteres reprodutivos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Melhoramento Animal).

Orientador: Heden Luiz Marques Moreira

Co-Orientador: Frank Siewerdt

Bernardo dos Santos Vaz

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

N972a Nunes, Marília Danyelle

Análise do polimorfismo nos genes CYP19a e CYP19b em *Oreochromis niloticus* da linhagem Supreme e suas relações com caracteres reprodutivos / Marília Danyelle Nunes ; orientador Heden Luiz Marques Moreira; co-orientadores Frank Siewerdt e Bernardo Vaz. Pelotas, 2011.-109f. ; il..- Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.Tilápia 2.Aromatase 3.Diferenciação sexual I Moreira, Heden Luiz Marques(orientador) II .Título.

CDD 636.084

Banca examinadora:

Dr. Heden Luiz Marques Moreira (presidente)

Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras

Dra. Josiane Bonel Raposo

Dr. Vitor Hugo Borba Manzk

Dra. Cecília Perez Calabuig

Dedico

À Deus meu salvador, à meu pai Saul Jorge Nunes e à meu esposo Marco Antônio que meu deu todo amor, carinho, compreensão e apoio em todas as minhas decisões.

*As benignidades do SENHOR
cantarei perpetuamente; com a minha
boca manifestarei a tua fidelidade de
geração em geração. Salmos, 89:1.
SENHOR, tu tens sido o nosso
refúgio, de geração em geração.
Salmos, 90:1*

Agradecimentos

Em um primeiro momento agradeço ao meu Deus, pois sem a presença de Jesus em minha vida não teria força para vencer.

Agradeço em especial ao meu pai Saul Jorge Nunes que sempre acreditou na minha capacidade, incentivando, aconselhando, dando amor, sendo exemplo de honestidade, perseverança, coragem e acima de tudo, um pai herói e que hoje está junto com Deus.

Meu esposo, não poderia deixar de agradecer pela imensa paciência que teve comigo durante minha caminhada, por terorado, pelas provações que tivemos que passar; obrigado, sem o teu amor e o teu carinho talvez não tivesse alcançado o meu objetivo, pois sei que sonhamos juntos.

Agradeço à minha mãe Maria Olina e às minhas irmãs Didi, Irene, Jussara e Suzara pelo incentivo, amor e carinho. Ao meu irmão Jorge, pelas risadas nos dias de descanso em Santana.

Aos meus cunhados Flávio e Marco, agradeço pelo carinho e amizade. E, ao meu sobrinho Arthur, pela compreensão e pelos dias de risadas.

Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas de trabalho, Janaína, Rafael, Carla, Diones, Marco, Liane, Eduarda, e Alceu. Os quais sempre foram compreensivos, incentivadores, companheiros e verdadeiros amigos.

Em especial agradeço à colega Celília pelo, carinho e atenção que dedicou para com o meu trabalho.

Agradeço também à outros amigos que muito ajudaram a desenvolver algumas etapas do meu projeto:

- Natália e Izane na “casa dos peixes”, que auxiliaram na criação das larvas de Tilápia, ajudando na alimentação dos peixes e na limpeza do sistema.

- Wilian, Daiane, Luciane e Raquel do Laboratório de Fisiologia Vegetal, auxiliaram-me nos géis de poliacrilamida.

- Gabriel da Biotecnologia, encontrando parcerias para desenvolver algumas técnicas necessárias para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço também à professora Cristina e a Rosiane, secretária do Departamento de Genética, por sempre estarem prontas à me ajudar, pelo carinho e amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela aprendizagem, atenção, carinho e amizade.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro ao meu projeto e a minha bolsa de mestrado.

Um agradecimento especial ao meu orientador Heden, que apostou na minha capacidade, que abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar meu sonho; que nos momentos de dificuldade me aconselhou, como um pai, que nos momentos de tristeza falava palavras de incentivo e que quando mais precisei foi quem me estendeu a mão. Professor muito obrigado por ser esse amigo.

Resumo

NUNES, Marília Danyelle. **Análise do polimorfismo nos genes *CYP19a* e *CYP19b* em *Oreochromis niloticus* da linhagem Supreme e suas relações com caracteres reprodutivos**. 2011. 108 folhas. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O complexo enzimático da aromatase é responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos nos vertebrados. Uma das principais enzimas deste complexo é o citocromo P450arom e a regulação da expressão gênica desta enzima está diretamente ligada à diferenciação sexual. O estrogênio é essencial para o desenvolvimento das gônadas e diversos processos fisiológicos, que vão desde o crescimento normal até o comportamento reprodutivo. Este estudo teve como objetivo correlacionar o polimorfismo nos genes *CYP19a* e *CYP19b*. Em um primeiro momento com três linhagens utilizadas na piscicultura brasileira (Chitralada, Supreme e GIFT) utilizando trinta animais de cada linhagem e, em um segundo momento somente com a linhagem Supreme a qual tem-se o objetivo também de analisar as proporções de sexo encontrado em dois tratamentos com temperaturas diferentes da água e estabelecer possíveis relações entre eles, analisando 122 animais do tratamento a 25°C e 129 animais do tratamento a 35°C. Após a extração de DNA as amostras foram submetidas a PCR utilizando os *primers* desenhados para flanquear uma região de interesse. Após confirmação da amplificação as amostras foram submetidas à separação eletroforética no aparato *Origins* para identificação dos alelos. No primeiro estudo foi identificado que existe um polimorfismo na região promotora de *CYP19b* nas três linhagens. Foram observados três alelos, variando entre 141 e 123 pb. Assim os *primers* para a amplificação de microssatélite na região regulatória do gene *CYP19b* foram

eficientes e, portanto, seu uso para identificação de mutações nesta região pode ser empregada na análise típica de microssatélite. No segundo trabalho foi identificado que há um polimorfismo na região regulatória do gene CYP19a, onde foram observados 5 padrões de bandas (supostamente alelos). A proporção de fêmeas e machos encontrada no tratamento a 25°C foi de 1:2,3 e de 1:2,88 no tratamento a 35°C. Contudo, supõe-se que o polimorfismo presente nesta porção da região regulatória pode estar relacionado à reversão sexual encontrada. Considerando a tentativa de selecionar indivíduos que apresentem polimorfismo na região regulatória dos genes da aromatase (CYP19a e CYP19b), é indispensável um estudo para avaliar os níveis de expressão de ambos, para que se possa observar como está sendo expressado em indivíduos que revertem ou não, possibilitando assim a reversão por temperatura com uma proporção mais elevada.

Palavras-chave: tilápia, aromatase, diferenciação sexual

Abstract

NUNES, Marília Danyelle. **Análise do polimorfismo nos genes *CYP19a* e *CYP19b* em *Oreochromis niloticus* da linhagem Supreme e suas relações com caracteres reprodutivos.** 2011. 108 folhas. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The aromatase enzyme complex is responsible for converting androgens into estrogens in vertebrates. One of the key enzymes of this complex is the cytochrome P450arom gene expression and regulation of this enzyme is directly linked to sexual differentiation. Estrogen is essential for the development of the gonads and various physiological processes, ranging from normal growth to reproductive behavior. This study aimed to correlate the polymorphisms in the genes *CYP19a* *CYP19b*. In a first moment with three strains used in aquaculture (Chitralada, Supreme and GIFT) using thirty animals of each strain and, a second time only with the Supreme strain which has also the objective of analyzing the sex ratios found in both treatments at different temperatures of water and to establish possible relationships between them, analyzing the 122 animals treated at 25 ° C and 129 animals of treatment at 35 ° C. After extraction of DNA samples were subjected to PCR using primers designed to flank a region of interest. After confirmation of amplification samples were subjected to electrophoresis on Origins apparatus for identification of alleles. In the first study was identified that there is a polymorphism in the promoter region of *CYP19b* in the three strains. Were observed three alleles, ranging from 141 to 123 bp. Thus the primers for amplification of microsatellites in the regulatory region of the gene *CYP19b* were efficient, and therefore its use for identification of mutations in this region can be employed in the typical analysis of microsatellites. In the second study was identified that there is a polymorphism in the regulatory region of the gene

CYP19a, 5 alleles were observed. The proportion of females and males found in the treatment at 25 ° C was 1:2,3 1:2,88 and treatment at 35 ° C. However, it can be assumed that the polymorphism present in this portion of the regulatory region may be related to sex reversal found. Whereas the attempt to select individuals with polymorphisms in the regulatory region of the aromatase gene (and CYP19a CYP19b) is an essential study to evaluate the expression levels of both, so you can see how it is being expressed in individuals that will reverse or not , allowing for the reversal temperature with a higher proportion.

Keywords: tilápia, aromatase, sexual differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção Mundial da Aqüicultura por Região em 2007.	35
Figura 2 – Produção da Pesca e Aqüicultura no Brasil	36
Figura 3 – Produção da Piscicultura de 2003 a 2009	37
Figura 4 – Crescimento Relativo da Pecuária e Aqüicultura 2007 - 2009	38
Figura 5 - Produção Nacional de Pescados em 2009 por Região.....	38
Figura 6 – Produção Nacional de Pescado em 2009 por Unidade de federação	39
Figura 7 – Produção de Piscicultura (Tilápia) no período de 1994 a 2009.....	40
Figura 8 – Larvas de Tilápia (4dpf) – Linhagem Supreme	42
Figura 9 – Alevinos de Tilápia (38 dpf) – Linhagem Supreme.....	42
Figura 10 – Tilápia adulta – Linhagem Supreme.....	43
Figura 11 – Esquema de determinação do sexo e de tratamentos direto de reversão sexual (GUIGUEN et al., 2010).	46
Figura 12 - Desenho esquemático da estrutura do gene <i>tCYP19b</i> e <i>tCYP19a</i> . Regiões de éxon e íntron são indicados por caixas abertas e sólidas, respectivamente. Os números nas caixas representam o tamanho dos fragmentos. Sítios de iniciação de transcrição e tradução estão marcadas com setas. (CHANG et al., 2005).	50
Figura 13 - Esquema dos genes envolvidos no processo de determinação e diferenciação sexual. Adaptado de D'Cotta et al. (2007); Ijiri et al. (2008); Baroiller et al., (2008 e 2009).	59
Artigo Submetido à revista Scientia Agraria Paranaensis	

Figura 1 - Checagem da amplificação para o locus microssatélites no gene *CYP19b* para amostras de Tilápia de diferentes linhagens. Canaletas de 1 a 13

amostras de DNA de Tilápia. N negativo e M marcador Generuler Ladder Mix (Fermentas). Gel de agarose 1% corado com Gelgreen e visualizado em luz UV....65

Figura 2 - Amplificações de microssatélites presente na região promotora do gene CYP19b para amostras de Tilápia em gel Spreadex® EL 600 Wide Mini S-2x25. 01 ao 07 = Linhagem Chitralada; 08 ao 14 = Linhagem GIFT; 15 ao 22 = Linhagem Supreme; N = controle negativo; M = marcador M3 marker; A, B e C = três diferentes alelos.66

Artigo Submetido à revista Aquaculture Research

Figura 1 – Sistema de recirculação de água do Laboratório de Engenharia Genética Animal da Universidade Federal de pelotas.....73

Figura 2 – Indicação das gônadas de Tilápia objeto de estudo.....74

Figura 3 – Foto de gônadas retiradas de um peixe do tratamento a 35°C. 74

Figura 4 - Gráfico da taxa de mortalidade de Tilápia da Linhagem Supreme nos tratamentos a 25°C (vermelho) e 35°C (preto) com 34 dias de tratamento.....77

Figura 5 – Gônada de fêmea tratamento a 25°C. 20x/0,5- Indicação da formação de ovócitos. Fixação em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina, cortados a 5-3µm de espessura e corados por hematoxilina-eosina.78

Figura 6 - Intervalos de comprimento total, dependendo do sexo da Tilápia, a 25 ° C (masculino, feminino e indeterminado).....80

Figura 7- Intervalos de comprimento padrão, dependendo do sexo da Tilápia, a 25 ° C (masculino, feminino e indeterminado).81

Figura 8 - Gônada de macho tratamento a 35°C. 20x/0,5 indicando espermatócitos. Fixação em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina, cortados a 5-3µm de espessura e corados por hematoxilina-eosina.82

Figura 9 – Gônada de indivíduo indefinido (T35). 20x/0,5 indicando a não formação de ovócito e nem formação de espermatócito, células sem definição. Fixação em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina, cortados a 5-3µm de espessura e corados por hematoxilina-eosina.82

Figura 10 - Intervalos de comprimento total dependendo do sexo da Tilápia a 35 ° C (masculino, feminino e indeterminado).....83

Figura 11 - Intervalos de comprimento padrão, dependendo do sexo da Tilápia a 35 ° C (masculino, feminino e indeterminado).84

Figura 12 - Gel GMA Wide Mini S-2x25. Ready-to-Use Gels for SSCP and Heteroduplex Analysis. Análise do padrão de bandas encontradas na região regulatória do gene *CYP19a* de *Oreochromis niloticus*. Padrões a, b, c, d, e. Tratamento = 25°C. Amostras de 1 a 23 amostras, M = marcador GeneRuler DNA Ladder Mix.....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção e Receita da Aqüicultura Mundial por Grupo de Espécies em 2007	36
Artigo Submetido à revista Aquaculture Research	
Tabela 1 – Taxa de mortalidade de Tilápia do Nilo da Linhagem Supreme, em ambos tratamentos (25°C e 35°C), durante o tratamento de 34 dias.....	77
Tabela 2 - Percentagens de sexos de <i>Oreochromis niloticus</i> da linhagem Supreme, após tratamento com temperaturas de 25°C e 35°C, a partir do 3° dia após a eclosão.....	79
Tabela 3 - Porcentagem de padrão de bandas encontrado nos dois tratamentos (25°C e 35°C) a partir do 3° dia após a eclosão em <i>Oreochromis niloticus</i> – linhagem Supreme.....	85

SUMÁRIO

Dados de catalogação na fonte:	1
1. Introdução	17
2. Projeto de Pesquisa	22
2.1. Caracterização do Problema	23
2.2 Objetivos e Metas	24
2.3 Metodologia e Estratégia de ação.....	25
2.3.1 PCR-SSCP para os genes da aromatase	25
2.3.2 Experimento de reversão sexual com temperatura.....	26
2.3.3 Análise estatística.....	26
2.4 Resultados e Impactos esperados.....	27
2.5 Cronograma, Riscos e Dificuldades	29
2.6 Outros Projetos e Financiamentos.....	29
2.7 Aspectos Éticos (quando aplicável).....	31
2.8 Referências Bibliográficas	31
3. Revisão da Literatura.....	35
3.1 Aquicultura mundial.....	35
3.1.1 Aqüicultura no Brasil	36
3.1.1.1 Produção de Tilápia no Brasil.....	39
3.2 Biologia da Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	40
3.3 Reversão sexual.....	44
3.3.1 Métodos diretos de reversão sexual.....	44
3.3.2 Métodos indiretos de reversão sexual.....	46
3.3.3 O uso da temperatura como alternativa de Reversão Sexual.....	47

3.4 Genes da cascata genômica envolvidos na diferenciação e na determinação sexual.....	49
3.4.1 Gene CYP19	49
3.4.1.1 Gene CYP19a – Aromatase ovariana.....	51
3.4.1.2 Gene CYP19b – Aromatase cerebral	52
3.4.3 Gene Sox9.....	56
3.4.4 Gene Foxl2.....	57
3.4.5 Gene Esr	57
3.4.6 Gene Dax1	58
3.4.7 Gene Amh.....	58
3.4.8 Gene Sf1	58
4. Artigo Submetido à revista Scientia Agraria Paranaensis	60
PRIMERS MICROSSATÉLITES VALIDADOS EM TILÁPIA DO NILO NO GENE DA AROMATASE CEREBRAL (CYP19B)	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
AGRADECIMENTOS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
5. Artigo Submetido à revista Aquaculture Research	69
Análise do gene <i>CYP19a</i> em <i>Oreochromis niloticus</i> e suas correlações com caracteres reprodutivos em alevinos da linhagem Supreme mantidos em sistema de recirculação de água.....	69
2. Material e Métodos.....	72
3 Resultados	76
5. Conclusões	88
6. Agradecimentos.....	88
7. Referências.....	88
6. Conclusões.....	91
7. Referências Bibliográficas	92

1. Introdução

A contribuição da aquicultura aos estoques de suprimento para o mundo continua crescendo. Segundo dados da FAO – “*Food and Agriculture Organization of United Nations*” (2009), a média anual observada é de 6,65% entre o ano de 1997 e 2007. Já no Brasil, os dados da estatística 2008-2009 do Ministério da Pesca e Aquicultura mostrou um sólido e substancial crescimento, chegando a 60,2% no período de 2003 a 2009.

A piscicultura vem crescendo graças a incentivos governamentais, tais como a criação do Ministério da Pesca e Aquicultura, Lei nº 11.958; Lei da Pesca – Lei nº 11.959; Resolução Conama - nº413; levando assim a criação da EMBRAPA Aquicultura e Pesca em 2009. O governo Federal, implementou diversas ações oriundas da política de desenvolvimento do setor, e com isso, o país está aumentando a produção aquícola.

O projeto AQUABRASIL foi criado pela EMBRAPA Pantanal que é um órgão do governo Federal em 2007 com o objetivo de desenvolver informações e tecnologias adaptadas às condições locais para melhorar o desempenho da aquicultura no país. Este projeto utiliza como objetos de pesquisa as espécies camarão marinho, *L. vannamei*; a Tilápia, *Oreochromis niloticus*; o tambaqui, *C. macropomum* e o pintado, *P. corruscans*. Abordam fatores como de melhoramento genético, nutrição e alimentação, biossegurança e sanidade, manejo e gestão ambiental dos sistemas de produção e aproveitamento agroindustrial num enfoque integrado de pesquisa em rede.

Segundo a FAO a produção de Tilápia está amplamente distribuída pelo mundo, sendo cultivada e representada em mais de 85 países. O Brasil possui o potencial de ser o maior exportador desse peixe para os EUA e outros países, devido ao seu clima favorável e abundantes recursos hídricos (WATANABE et al., 2002). Nos últimos três anos, segundo a coletiva do Ministério da pesca e Aquicultura, estatística 2008 e 2009, a produção aumentou 86%, chegando a ultrapassar 130 mil toneladas.

A Tilápia é uma espécie exótica introduzida no Brasil, representada por linhagens melhoradas, apresenta 39% do total pescado proveniente da piscicultura continental, segundo a estatística do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) em 2009.

Com o objetivo de aumentar a produção brasileira de Tilápia, foram introduzidas três linhagens no país, a Chitralada, importada em 1996 pela Associação de produtores de alevinos do estado do Paraná sendo proveniente da Costa do Marfim, (MOREIRA et al., 2000), a Supreme, em 2004 introduzida pela Larvicultura Aquabel que foi desenvolvida pela empresa Norueguesa Genomar e a GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), que em 2005 foi recebida pela Universidade Estadual de Maringá proveniente da Malásia desenvolvida pela *World Fish Center*. Segundo o Panorama da Aqüicultura (2007) estas introduções contribuíram significativamente com a expansão da tilapicultura no Brasil.

A Tilápia alcança sua maturidade sexual muito cedo, geralmente entre o 4° ou 6° mês de vida (KUBITZA, 2000). Ao atingir a maturidade sexual, desvia sua energia para a reprodução e cuidado parental e, devido à alta prolificidade, acaba gerando superpopulação nos ambientes de cultivo (KUBITZA, 2000) e competição por espaço e alimento (CARVALHO e FORESTI, 1996), causando uma redução da taxa de crescimento e até a mortalidade devido à depreciação da qualidade da água.

Com o objetivo de solucionar o problema de superpopulação nos tanques e o fato dos machos apresentarem taxa de crescimento superior às fêmeas (TACHIBANA et al., 2004), diversas técnicas foram, implantadas para obtenção de populações monossexuais masculinas.

Inicialmente, técnicas foram baseadas apenas na redução da atividade reprodutiva, como por exemplo, o uso de gaiolas, redução do crescimento dos filhotes, o policultivo com peixes predadores ou constante despesca dos viveiros de cultivo (BOMBARDELLI et al., 2004). Logo, outras técnicas mais eficazes, baseadas na manipulação direta e indireta do sexo fenotípico dos peixes foram utilizadas, baseadas na eliminação das fêmeas dos ambientes de cultivo a partir de reversão sexual por tratamentos hormonais e manipulação genética ou ambiental (BOMBARDELLI, et al., 2004).

Os métodos diretos atuam sobre os processos fisiológicos que determinam masculinização, feminilização ou esterilização. Estes métodos são os mais difundidos e utilizados como, por exemplo, o uso de hormônios esteróides androgênicos (POPMA e LOVSSHIN, 1996; BEADMORES et al., 2004) que visa eliminar ou minimizar a reprodução nos tanques, alcançar uma maior produção através do melhor crescimento dos machos, e obter uma maior uniformização dos lotes. Entretanto, o uso de hormônios na produção animal tem sido questionado em

qualquer fase de criação, dosagem ou tempo de utilização em animais destinados ao consumo humano. Assim, buscam-se alternativas devido à preocupação dos consumidores com os efeitos residuais dos hormônios esteróides no meio ambiente e na saúde humana (OLIVEIRA et al., 2008).

Segundo Donaldson (1996), os tratamentos indiretos atuam sobre processos genéticos ou variáveis ambientais, os quais influenciarão indiretamente os processos fisiológicos que determinam o sexo fenotípico.

A Tilápia do Nilo é documentada com probabilidade de ser a melhor espécie para demonstrar o complexo sistema de determinação do sexo, conhecido como “Sexual determinatiom system” (SDS) (BAROILLER et al., 1995; BAROILLER e D’COTTA, 2001). O SDS é um sistema biológico que determina o desenvolvimento das características sexuais dos organismos. Distinguem-se em dois tipos de sistemas:

- Determinação genética do sexo (GSD), onde as características são determinadas por fatores contidos nos cromossomos; esta pode ser classificada em determinação cromossômica, quando existem cromossomos heteromórficos; determinação genética, quando os cromossomos são homomórficos; e determinação por haplodiploidia, quando um dos sexos possui a metade da dotação cromossômica do outro sexo.

- Determinação ambiental do sexo (ESD), onde as características são determinadas por fatores ambientais, como é o caso do sistema TSD (Determinação por temperatura), estabelecido pela temperatura de incubação.

O GSD é um sistema baseado predominantemente em um sistema monofatorial genotípico com machos heterogaméticos (JALABERT et al., 1974; PENMAN et al., 1987; SCOTT et al., 1989; MAIR et al., 1991) e com uma menor influência genética de fatores independentes (autossômicos) e/ou epistáticos para determinação do sexo (LESTER et al., 1989; MAIR et al., 1991; WOHLFARTH e WEDEKIND, 1991; BAROILLER et al., 1996; ABUCAY et al., 1999; BAROILLER e D’COTTA, 2001; EZAZ et al., 2004).

Em Tilápia nilótica a determinação sexual está sob controle cromossômico (XX e XY) e fatores desencadeantes ambientais. Ela é uma espécie gonocórica indiferenciada sexualmente (ROWELL et al., 2002), desenvolvem primeiramente suas gônadas em ovários, onde a partir de um certo período de vida, metade da

população apresenta degeneração do tecido ovariano e formação dos testículos (YAMAZAKI, 1983; CARVALHO, 1985; DELVIN e NAGAHAMA, 2002).

Segundo Baroiller (1995), a determinação do sexo é predominantemente determinada pela existência de um grande gene localizado em um par de cromossomos sexuais. Mas em Tilápias, como na maioria dos peixes teleósteos, as relações de sexo são influenciadas por certos fatores exógenos específicos, como a temperatura.

Além disso, a diferenciação sexual requer uma variedade de vias bioquímicas envolvendo muitas proteínas diferentes, como por exemplo, fatores de transcrição, enzimas, receptores, sistemas de segundo mensageiro, e outros. (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002), e como a temperatura pode influenciar grandemente na estrutura e função destas moléculas, a reversão sexual por temperatura vem sendo estudada por vários pesquisadores como método alternativo ao tratamento hormonal (BARAS et al., 2000; WANG e TSAI, 2000; BARAS et al., 2001; TSAI et al., 2003; AZAZA et al., 2008). Esses estudos fornecem evidências de que a temperatura baixa da água (~25°C) favorece a diferenciação sexual feminina enquanto que a temperatura alta (~35°C) favorece a diferenciação sexual masculina.

Muitas pesquisas mostram que os genes envolvidos no processo de diferenciação sexual, muitos já seqüenciados, envolvem uma cascata genômica e desempenham papéis importantes nos mecanismos de determinação, como o fator de transcrição 1 (*Dmrt1*), os receptores de estrogênio (*Esr*), o *Amh*, o *Sf1*, o *Dax1*, o gene 9 contendo box-HMG (*Sox9*), o *FoxL2* e a aromatase *CYP19a* e *CYP19b* (RAYMOND et al., 2000; TEVOSIAN et al., 2002; NES e ANDERSEN, 2006; LIU et al., 2008). A sensibilidade desses mecanismos à temperatura tem sido provada e o direcionamento do desenvolvimento do sexo fenotípico pode ser realizado em muitas espécies (NES e ANDERSEN, 2006).

A enzima *P450* aromatase (*P450arom*, *CYP19*), é um produto do gene *CYP19*, é um membro da superfamília do *citocromo P450* que catalisa a formação de estrógeno a partir de andrógenos (GUIGUEN, 2010). A enzima-chave para equilibrar a relação dos hormônios esteróides é a *CYP19* aromatase (que é a enzima terminal no caminho da esteroidogênese). A expressão adequada desta enzima é essencial para diferenciação do sexo e para reprodução em animais vertebrados (SCHALBURG, 2009). A aromatase, que se expressa principalmente no ovário foi designado *CYP19a* / *P450aromA* / *CYP19A1* e o tipo que se expressa em

um alto nível no cérebro e é fortemente induzido pelo estrogênio foi designada *CYP19b/P450aromB/CYP19A2* (CHANG et al., 2005).

O gene da aromatase apresenta uma expressão precoce no ovário e foi localizado em um subconjunto de células somáticas no momento de diferenciação em gônadas de trutas arco-íris (VIZZIANO et al. 2007), em Tilápia do Nilo (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002) e em Medaka japonês (SUZUKI et al., 2004). Em Tilápia do Nilo, a presença da aromatase foi detectada usando um anticorpo específico durante a diferenciação das gônadas em fêmeas genética em um subconjunto de células claras localizado em um lado das gônadas na proximidade dos vasos sanguíneos (STRÜSSMANN e NAKAMURA, 2002; SAKAI et al., 2008).

Mas os primeiros padrões de expressão gênica da aromatase podem ser detectados cerca de 30 dpf (VIZZIANO et al., 2007), apresentando altos níveis em fêmeas e baixos níveis em machos, conforme sugerem vários autores (CHANG et al., 2005).

No entanto, o padrão de expressão e a função da cascata de genes envolvidos no processo de diferenciação sexual, sugerem que esses genes fazem parte de uma rede de sinalização responsável pelo desenvolvimento específico das gônadas sexuais (WANG, 2010); porém, estudos ainda não comprovaram de que forma estes fatores de transcrição estariam atuando nesta mesma fita transcrita e quais seriam esses elementos que estão atuando no gene alvo. Com isso, ainda não está elucidado o momento em que a temperatura estaria atuando neste processo.

Embora existam algumas pesquisas sobre genes expressos em Tilápias, até o momento não há nenhum relato do estudo da variação genética nos genes da aromatase e de sua relação com características reprodutivas nas linhagens em uso na piscicultura brasileira. Portanto, o objetivo deste estudo é identificar se existe variação de polimorfismo de nucleotídeo simples nos genes da aromatase, em Tilápia (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Supreme utilizada na piscicultura brasileira. Caso seja identificada a variação genética neste gene, buscar estabelecer se há uma relação de causa e efeito sobre proporção de reversão sexual e caracteres reprodutivos destas linhagens.

2. Projeto de Pesquisa

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico

Modelo Estruturado

Análise do polimorfismo de nucleotídeo simples dos genes CYP19 (citocromo P450) em diferentes linhagens de Tilápia do Nilo

Equipe: Heden Luiz Marques Moreira – Coordenador

Bernardo dos Santos Vaz – Pós-doc Cenbiot – UFPel

Diones Bender Almeida – Doutorando PPZ

Carla Giovane Ávila Moreira – Doutoranda Cenbiot - UFPel

Rafael Aldrigh Tavares – Mestrando PPZ

Janaína da Silva Camacho – Bióloga – UFPel

Marília Danyelle Nunes – Bióloga - UFPel

Plínio A. Oliveira - aluno de IC UFPel

Llane Bassini – IC UFPel

Marília Danyelle Nunes

Pelotas, julho de 2009

2.1. Caracterização do Problema

No Brasil atualmente existem três linhagens melhoradas de Tilápia: a linhagem Chitralada, a linhagem Supreme e a linhagem Gift. Estas introduções contribuíram significativamente com a expansão da tilapicultura no país (Panorama da Aqüicultura, 2007). Uma forma de acelerar o processo de melhoramento genético é com o uso de marcadores moleculares na seleção assistida por genes (marcadores diretos). Para Schötterer (2004) o objetivo da análise com marcadores com fins de melhoramento genético, é tentar estabelecer se há uma associação entre o polimorfismo observado no marcador e o valor fenotípico da característica de interesse.

Algumas publicações têm demonstrado que muitos marcadores sexuais possuem papéis essenciais na produção dos peixes (Price, 1984; Devlin and Nagahama, 2002). Alguns marcadores ligados ao sexo têm sido identificados através de estudos de ligação genética em Tilápias (Lee et al., 2003). Contudo, uma dissecação de maior resolução é necessária para saber se estes marcadores estão presentes em genes atuando diretamente na determinação e/ou diferenciação do sexo, ou próximo de genes que realizam esta função.

Hormônios são utilizados para reversão sexual em Tilápias para aumentar a produção de machos e uniformização dos lotes. Embora este método seja o mais utilizado, existe hoje uma tendência de utilização de técnicas indiretas e diretas que não utilizam estes compostos. A busca destas alternativas ocorre principalmente, devido à preocupação dos consumidores com os efeitos residuais dos hormônios esteróides com o meio ambiente e a saúde humana (Oliveira et al., 2008). Alguns pesquisadores utilizam a temperatura para reversão sexual ao tratamento de hormônios (Baras et al., 2001; Tessema et al., 2006) e, a resposta a esta reversão apresenta um fundo genético, devido expressão de proteínas envolvidas nas vias bioquímicas. Contudo é importante identificar o(s) gene(s) envolvido neste controle de resposta da reversão sexual. Pois este indicativo se baseia no fato que vários trabalhos confirmaram que o estrogênio é requerido para diferenciação dos ovários (Nakamura et al., 1998; Kwon et al., 2000; Kobayashi et al., 2003).

O complexo enzimático da aromatase é responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos em vertebrados. Uma das principais enzimas deste complexo é citocromo P450arom. Portanto, a regulação da expressão gênica desta enzima está diretamente ligada à diferenciação sexual. Tem sido provado que altas temperaturas deprimem a expressão do gene da aromatase ou de fatores transcricionais para a sua expressão durante a diferenciação sexual em peixes (Baroiller e D'Cotta, 2001; D'Cotta et al., 2001; Tsai et al., 2003). Portanto, uma análise do polimorfismo nos genes que controlam esta enzima pode gerar conhecimentos sobre o comportamento diferencial da resposta a reversão por temperatura. Contudo, poucos relatos de Polimorfismo de Nucleotídeo Simples (SNP) têm sido publicados em espécies utilizadas na aquicultura (He et al., 2003, 2008; Heikki and Craig, 2006; Hayes et al., 2007).

Embora existam alguns estudos sobre genes expressos em Tilápias até o momento não há nenhum relato do estudo da variação genética nos genes da aromatase e de sua relação com características reprodutivas nas linhagens em uso na piscicultura brasileira. Portanto, o objetivo desta pesquisa é identificar se existe variação de polimorfismo nucleotídeo simples nos genes da aromatase em diferentes linhagens de Tilápia utilizadas na piscicultura brasileira. Caso seja identificado variação genética neste gene buscar estabelecer se há uma relação de causa e efeito sobre proporção de reversão sexual e caracteres reprodutivos destas linhagens.

2.2 Objetivos e Metas

Objetivo do ponto de vista do conhecimento científico:

- Identificar as variantes dos genes da aromatase em diferentes linhagens de Tilápias utilizadas na piscicultura brasileira;
- Avaliar comparativamente aspectos reprodutivos das linhagens GIFT, Chitralada e Supreme e;
- Correlacionar o polimorfismo genético nos genes da aromatase com caracteres reprodutivos de forma a obter marcadores para seleção de animais que respondem melhor a reversão sexual por temperatura.

2.3 Metodologia e Estratégia de ação

Os experimentos de campo (cultivo das linhagens) e coleta de material para análise genética se realizados na cidade de Rolândia e Maringá, PR, nas instalações da Piscicultura Aquabel e Universidade Estadual de Maringá. A genotipagem dos animais será realizada no Laboratório de Engenharia Genética Animal (LEGA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Obtenção do material genético: O DNA genômico será obtido a partir de amostras de tecido coletadas de diferentes linhagens utilizando-se uma tesoura para o corte de aproximadamente 1cm² da nadadeira caudal.

O anestésico utilizado será a benzocaína em meio aquoso, que tem como princípio ativo o éster etílico do ácido para-aminibenzóico, sendo utilizado em mamíferos e peixes como um enestésico local. Os peixes são colocados em um banho de água oxigenada contendo o anestésico. Uma vez que o peixe perder o equilíbrio pode ser removido do banho, onde será contido sobre uma esponja umedecida e um pano também umedecido para cobri-lo e manipulá-lo. A escolha do anestésico e da dose para os peixes é dependente de uma série de fatores, incluindo temperatura da água, da idade ou da maturidade do peixe e do procedimento. Para este anestésico, a dose varia de 20 a 100mg/L e os tempos de indução em intervalo de 2-4 minutos, com recuperação completa em 5-10 minutos. Ao término do manejo, os animais recuperados são imersos em água saturada de oxigênio.

Para eutanásia, o peixe será submetido a uma quantidade mais elevada do mesmo anestésico.

2.3.1 PCR-SSCP para os genes da aromatase

Esta análise identifica se há variação genética no gene da aromatase CYP19 e a caracterização dos genótipos derivados da combinação dos diferentes alelos. Serão obtidas amostras aleatórias de 50 reprodutores para análise do polimorfismo (Chang et al., 2005). O DNA genômico será extraído de acordo com o procedimento estabelecido por Lahiri e Nurnberger (1991). Serão desenhados com o programa Vector NTI 8.0 (Invitrogen, USA) 11 pares de primers. As reações de PCR serão conduzidas em um volume total de 25 µl: 50

ng de DNA, 0,20 mM de dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 0,20 mM de cada primer and 0,5 U Taq DNA polimerase. Os produtos de PCR serão genotipados de acordo com a técnica de SSCP (Sunnucks et al., 2000). O produto do PCR será separado em aparato de eletroforese de alta resolução em matriz GMA (Elchrom Scientific, Switzerland) de acordo com as especificações do fabricante. A revelação será realizada utilizando corante Gelgreen (Biotin,USA) e visualizados em transluminador DarkReader (Clare Chemical Research, USA)(Dam et al., 2001). Genótipos individuais serão definidos de acordo com o padrão de bandas.

2.3.2 Experimento de reversão sexual com temperatura

Com o objetivo de correlacionar o efeito da temperatura com os alelos observados nos animais amostrados e a proporção de sexo resultante, a linhagem que apresentar maior polimorfismo nos genes em estudo será submetida a um experimento para avaliar o efeito da temperature (27 e 34°C). A proporção de sexo será analisada usando o método acetocarmin para sexagem de juvenis (Guerrero and Shelton, 1974). Amostras de 50 peixes serão sacrificadas aleatoriamente usando anestésico. Uma peça da gônada será removida e corada com acetocarmin, para realização da análise histológica. A determinação do sexo será baseada na presença de oócitos para fêmeas e na morfologia lobular dos testículos em machos.

2.3.3 Análise estatística

A diversidade genética dentro das linhagens será caracterizada pelas frequências genotípicas, heterozigosidade observada (H_0), diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), porcentagem de loci polimórficos (P) para cada um dos 9 intervalos gênico a serem avaliados pela técnica de SSCP. Estas estimativas serão obtidas pelo uso do programa Genepop 3.0 (Raymond e Rousset 1995). A sobrevivência dos diferentes lotes irá ser comparada utilizando o teste de (χ^2). A significância dos desvios da proporção de sexo será analisada utilizando uma tabela de contingência de qui-quadrado 2x2 com um nível de significância de $P < 0,05$. Serão formados diplótipos com o programa Phase 2.0 a partir dos SNPs que apresentem polimorfismo. As associações entre os genótipos e os diplótipos dos SNPs

polimórficos dos genes da aromatase e as características E2, IHS e IGS e efeitos genéticos serão analisados respectivamente pelo procedimento GLM do pacote estatístico SAS. Outros efeitos, tais como sexo, local, data de abate não serão levados em consideração, uma vez que todos os peixes a serem utilizados serão fêmeas, abatidas na mesma idade e mesmo procedimento. Diferenças significantes entre médias de quadrados mínimos de diferentes genótipos ou diplótipos serão calculadas utilizando o teste de Duncan.

2.4 Resultados e Impactos esperados

Indicadores de Progresso ao final de cada 6 meses de projeto:

Publicações de artigos científicos em revistas qualis A internacional e qualis A nacional. Tendo assim uma repercussão positiva na sociedade científica.

Contudo, uma avaliação positiva dos relatórios prestados semestralmente ao Programa de Pós Graduação.

Indicadores de resultados ao final do projeto:

As informações geradas durante a execução deste projeto serão comunicadas em congressos da área, bem como será realizada a publicação de artigos científicos em revistas especializadas e conceituadas pelo Qualis.

O estabelecimento da diversidade genética baseada nos genes em estudo, tanto no eixo somatotrópico como nos genes ligados a reprodução nestas linhagens permitirá a orientação do programa de conservação destes recursos, bem como a orientação dos cruzamentos nas etapas de seleção.

A partir da identificação do efeito de substituição gênica nos genes em análise e comprovando a relação de causa e efeito poderá ser possível empregar a seleção assistida baseada nos alelos favoráveis dentro destas linhagens, o que permitirá a geração de animais melhorados para o fornecimento das larviculturas multiplicadoras. Com a inclusão de material melhorado o crescimento contínuo da produção de Tilápias poderá ser mantido ou elevado.

Com utilização de marcadores no processo de seleção das linhagens envolvidas permitirá a comparação das estratégias de seleção tradicional e

assistida. Em virtude da inexistência deste tipo de aplicação na piscicultura nacional, este projeto contribuirá de forma marcante para a formação de recursos humanos na área de melhoramento genético. Além disso, A geração de informações sobre a correlação entre os caracteres quantitativos e a variabilidade genética de linhagens de Tilápia poderá, num futuro próximo, incentivar o desenvolvimento de programas de melhoramento genético em diferentes regiões, utilizando como base peixes exóticos e nativos, atendendo a realidade brasileira da piscicultura.

Repercussão e/ou impactos dos resultados:

Uma repercussão é resolver, através do conhecimento científico, o gargalo tecnológico que existe na piscicultura devido à falta de programas de seleção genética de Tilápias utilizadas na piscicultura no Brasil. Ao mesmo tempo, desenvolver tecnologia nacional para melhoramento que poderá ser empregada em diferentes espécies de peixes. Com isso haverá um impacto econômico com diminuição dos custos de produção e conseqüente aumento na renda de produtores de Tilápia, advinda da economia no pagamento de royalties ou através da redução dos custos de produção devido ao melhor desempenho da nova linhagem.

2.5 Cronograma, Riscos e Dificuldades

Atividades	2009												2010												2011				
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F					
Obtenção de créditos	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x	x								
Coleta de tecidos		x	x	x																									
Extração de DNA			x	x	x																								
Análise de SSCP (entre linhagens)				x	x	x	x																						
Sequenc.				x	x	x	x																						
Experimento de reversão									x	x	x	x	x																
Coleta de dados													x																
Análise de SSCP (experimento de reversão)														x	x	x	x												
Análise estatística																		x	x	x									
Revisão da literatura	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
Redação da dissertação																					x	x	x						
Defesa da dissertação																													x

2.6 Outros Projetos e Financiamentos

Projetos em andamento na linha de melhoramento genético e reprodução:

Diones Bender Almeida. Análise do polimorfismo em genes ligados ao eixo somatotrópico em linhagens de tilapia. Início: 2008. Tese (Doutorado em Pós-graduação em Zootecnia) Universidade Federal de Pelotas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador – Heden L. M. Moreira).

Rafael Aldrigh Tavares. Clonagem da região promotora do GH e PRL em peixe-rei. Início: 2008. Dissertação (Mestrado em Pós-graduação em Zootecnia) - Universidade

Federal de Pelotas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador – Heden L. M. Moreira).

Bernardo dos Santos Vaz. Clonagem da região promotora do hormônio do crescimento em jundiá (*Rhamdia quelen*). Pós-doutorado Centro de Biotecnologia – UFPel. (Orientador – Heden L. M. Moreira).

Janaína da Silva Camacho. Estimativa do polimorfismo genético no primeiro intron do locus do hormônio de crescimento do jundiá (*Rhamdia quelen*). Início: 2007. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pelotas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. (Orientador – Heden L. M. Moreira).

Heden Luiz Marques Moreira. Clonagem e sequenciamento do gene da protamina de jundiá *Rhamdia quelen* e análise da expressão de gene marcador tecido específico.

Marco André Paldes da Costa. Marcadores moleculares no eixo-somatotrópico de bovinos de corte. Início: 2008. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação Departamento de Zootecnia) - Universidade Federal de Pelotas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador – Heden L. M. Moreira).

Outros projetos do PPGZ desta linha de pesquisa:

- Avaliação genética em bovinos de corte das raças européias e suas cruzas;
- Cruzamento industrial entre machos Border Leicester com ovelhas Corriedale e Ideal para produção de carne;
- Estimativas de parâmetros genéticos para a produção de leite acumulada na lactação e de controles individuais de produção da raça Jersey ajustadas por diferentes modelos estatísticos;
- Formação de uma linhagem de codornas de corte com seleção aos 21 dias de idade e avaliação da produção de ovos através de modelos de regressão aleatória;
- Influência genética e ambiental sobre as características de desempenho produtivo de espécies de interesse zootécnico no Rio Grande do Sul;
- Inseminação artificial em tempo fixo com pessários intravaginais em bovinos;
- Uso do benzoato de estradiol na manifestação de cios e fertilidade em vacas pós-parto;
- Utilização de banco de dados como ferramenta para a tomada de decisões na bovinocultura de corte através do uso de simulações;
- Utilização de modelos de regressão aleatória na avaliação genética de bovinos de corte;

Projetos ligados aos Sistemas de Produção

- Avaliação da densidade de cultivo do jundiá (*Rhamdia* sp.) em tanque rede de pequeno volume.
- Avaliação da extração e uso da hipófise do biru (*Cyphocharax voga*) para a indução da desova do jundiá (*Rhamdia* sp.)
- Avaliação zootécnica e seleção genética de jundiá (*Rhamdia* sp.)
- Produção intensiva de jundiá (*Rhamdia* sp.) em tanque rede.

2.7 Aspectos Éticos (quando aplicável)

Serão utilizados pelo menos 100 peixes de cada linhagem, os quais serão sacrificadas aleatoriamente usando anestésico Cloridrato de Benzocaína (20mg/L). Uma peça da gônada será removida e corada com acetocarmin, para realização da análise histológica. Com este experimento é possível a análise de oócitos e testículos, para que assim possa ser analisada com melhor acurácia a reversão sexual do alevino.

Uma quantidade mais elevada de anestésico serão utilizados para que os animais entrem em eutanásia. Posteriormente será realizado um corte cervical e a retirada das gônadas.

2.8 Referências Bibliográficas

Almeida, D.B. Variação genética do marcador de microssatélite na região regulatória do hormônio de crescimento e prolactina em diferentes grupos genéticos de Tilápia do Nilo. 2008 (dissertação de mestrado).

Baras, E., Jacobs, B., Mélard, C. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX–XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, vol. 192, p.187–199, 2001.

Baroiller, J.F., D'Cotta, H. Environment and sex determination in farmed fish. Comp. Biochem. Physiol., Part C Pharmacol. Toxicol., vol. 130, p.399–409, 2001.

Bezault, E.; Clota, F.; Derivaz, M.; Chevassus, B.; Baroiller, J-F. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. Aquaculture, vol. 272, S1, p.S3-S16, 2007.

Bishop, M.D.; Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Stone, R.T.; Sunden, S.L.F.; Hawkins, G.A.; Toldo, S.S.; Fries, R.; Grosz, M.D.; Yoo, J.; Beattie, C. W. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136: 619-639, 1994.

Chang, X.; Kobayashi, T.; Senthilkumaran, B.; Kobayashi-Kajura, H.; Sudhakumari, C.C.; Nagahama, Y. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, vol. 141, p. 101–115, 2005.

Daum, H.A.; Meis, R.; Fiandt, M.; Hoffman, L.M.; Seville, M. Drug Discovery. Tutorial: Dark Reader transluminator. *Genetic Engineering News*, vol. 21, n. 19, p.1-4, 2001.

D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., Baroiller, J.F. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction Developmental*, vol. 59, p. 265–276, 2001.

Devlin, R.H., Nagahama, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, vol. 208, p.191–364, 2002.

Guerrero, R.D., Shelton, W.L. An acetocarmine squash method for sexing juvenile fishes. *Prog. Fish Culturist*, vol. 36, p.56, 1974.

Hayes, B., Laerdahl, J.K., Lien, S., Moen, T., Berg, P., Hindar, K., Davidson, W.S., Koop, B.F., Adzhubei, A., Høyheim, B. An extensive resource of single nucleotide polymorphism markers associated with Atlantic salmon (*Salmo salar*) expressed sequences. *Aquaculture*, vol.265, p.82–90, 2007.

He, C., Chen, L., Simmons, M., Li, P., Kim, S., Liu, Z.J. Putative SNP discovery in inter specific hybrids of catfish by comparative EST analysis. *Animal Genetics*, vol.34, p.445–448, 2003.

He, F.; Wen, H.S.; Dong, S.L.; Shi, B.; Chen, C.F.; Wang, L.S.; Yao, J.; Mu, X.J.; Zhou, Y.G. Identification of single nucleotide polymorphism cytochrome P450-c19a and its relation to reproductive traits in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, vol. 279, p.177-181, 2008.

Heikki, J.R., Craig, R.P. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in duplicated genomes: intron-primed exon-crossing (IPEC) as a strategy for avoiding amplification of duplicated loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and other salmonid fishes. *BMC Genomics*, vol. 7, n.192, p.1–11, 2006.

Kinghorn, B.P. Genetic variation in food conversion efficiency and growth in rainbow trout. *Aquaculture* 32, p. 141–155, 1983.

Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Nagahama, Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. *Cytogenetic Genome Research*, vol. 101, p.289–294, 2003.

Kwon, J.Y., Haghpanah, V., Kogson-Hurtado, L.M., McAndrew, B.J., Penman, D.J. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *Journal of Experimental Zoology*, vol.287, p.46–53, 2000.

Lahiri, D.K.; Nurnberger, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, no. 19, p.5444, 1991.

Lee, B.Y., Penman, D.J., Kocher, T.D. Identification of a sex determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Animal Genetics*, vol. 34, p.379–383, 2003.

Moreira, H.L.M. Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélites. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1999. 99p. (tese de doutorado).

Moreira, H. L. M. ; Dellagostin, O. A.; ERDTMANN, B.. Levels of inbreeding and relatedness in breeder stocks of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) detected by microsatellite analysis.. In: ISTA V, 2000, Rio de Janeiro. Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 2000. p. 59-67.

Nakamura, M., Chang, X.-T., Kobayashi, T., Kajiura, H., Nagahama, Y. Gonadal sex differentiation in fish. *Journal Experimental Zoology*, vol. 281, p.362–372, 1998.

Oliveira, P.A.; et al. Avaliação da reversão sexual de alevinos de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) com o uso de Vorozol em estufa. In.XVI Congresso de Iniciação Científica. Anais.Pelotas, 2008.<www.ufpel.tche.br/cic/2007/cd/pdf/CA/CA_00913.pdf>

Price, D.J. Genetics of sex determination in fishes—a brief review. In: Potts, G.G., Wootton, R.J. (Eds.), *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. Academic Press, London, pp. 77–89, 1984.

Raymond M, Rousset F. Genepop (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*, vol. 86, 248–249, 1995.

Schotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews in Genetics*, vol.5, p.63-69, 2004.

Sunnucks, P.; Wilson, A. C. C.; Beheregaray, L. B. ; Zenger, K.; French, J.; Taylor, A. C. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation

polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, vol. 9, p.1699-1710, 2000.

Tessema, M., Müller-Belecke, A., Hörstgen-Schwark, G.. Effect of rearing temperatures on the sex-ratios of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture*, vol. 258, p.270–277, 2006.

Tsai, C.-L., Chang, S.-L., Wang, L.-H., Chao, T.-Y. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain. *Journal Neuroendocrinology*, vol. 15, p. 97–102, 2003.

Wessels, S.; Hörstgen-Schwark., G. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. *Aquaculture*, vol. 272, S1, p. S80–S87, 2007.

3. Revisão da Literatura

3.1 Aquicultura mundial

Segundo dados da FAO “Food and Agriculture Organization of United Nations” (2009), o crescimento médio observado da entre os anos de 1997 e 2007 foi de 6,65% ao ano, chegando em 2007 com uma produção de 65.190.031 toneladas (Figura 1).

Esta alta produção se deve principalmente ao continente asiático, que participa com 91,11% da produção mundial na aqüicultura. Seguido dele, vem a Europa com 3,59%, a América do Sul com 1,96%, a América do Norte e Central com 1,8%, a África com 1,27% e a Oceania com 0,26% (Figura 1).

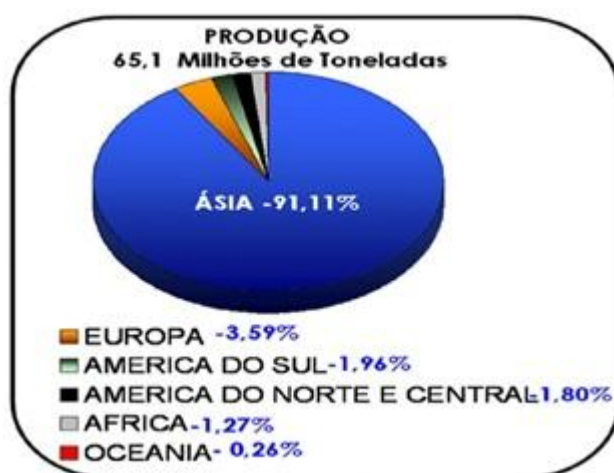


Figura 1 – Produção Mundial da Aqüicultura por Região em 2007.
Fonte: FAO, 2009

As principais espécies cultivadas mundialmente são representadas pelo grupo das Carpas, que se destacam pelo volume de produção, onde segundo dados da FAO para o ano de 2007 tiveram um total de 14.892.443 toneladas, representando 22,84% do total produzido, na sequência Tilápias com 2.505.465 toneladas e salmão e trutas com 2.254.944 toneladas (Tabela 1).

Tabela 1 - Produção e Receita da Aqüicultura Mundial por Grupo de Espécies em 2007

NOME	VOLUME (TONELADAS)	%	VALOR US\$ BILHÕES	%
Carpas	14.892.443	22,84	14,88	15,74
Ostras	4.401.030	6,75	3,22	3,41
Mariscos	4.213.342	6,46	4,34	4,59
Camarões	3.275.726	5,02	13,41	14,19
Tilápias	2.505.465	3,84	3,30	3,49
Salmão e Trutas	2.254.944	3,46	11,10	11,75
Mexilhões	1.630.795	2,50	1,61	1,70
Subtotal	33.173.745	50,89	51,86	54,87
Outros	32.016.285	49,11	42,64	45,13
Total	65.190.029	100	94,50	100

Fonte: FAO 2009.

3.1.1 Aqüicultura no Brasil

Segundo o IBAMA (2009) a Pesca e Aqüicultura no Brasil tiveram uma produção no ano de 2009 de 1.240.813 toneladas (Figura 2).

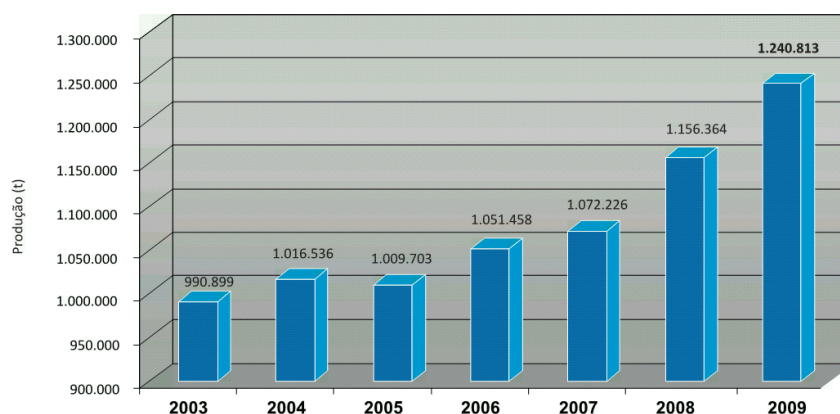


Figura 2 – Produção da Pesca e Aqüicultura no Brasil.

Fonte: Ministério da Pesca e Aqüicultura – Estatística 2008 e 2009

Através de incentivos do Governo Federal, como a criação do Ministério da Pesca e Aquicultura, Resolução Conama e a Criação de um pólo da EMBRAPA exclusivo para Aquicultura e Pesca, alavancou o setor, trazendo desenvolvimento e cultura.

Em um comparativo tempo de produção (2003 a 2009), a pesca continental tem mostrado oscilações, fechando o ano de 2009 com 239.492 toneladas (IBAMA, 2009).

A aquicultura nacional teve um crescimento substancial entre os anos de 2003 a 2009, chegando a produção de 415.649 toneladas, cerca de 49% superior ao ano de 2003 (IBAMA, 2009). E a expectativa para 2011, segundo os dados do Plano de pesca e Aquicultura do Ministério da Pesca é que a produção chegue a 570.000 toneladas.

A piscicultura continental brasileira também tem mostrado um sólido e constante crescimento, com a produção indo de 177.125 toneladas em 2003 para 337.353 toneladas em 2009, com um crescimento de 60,2% neste período (IBAMA, 2009) (Figura 3).

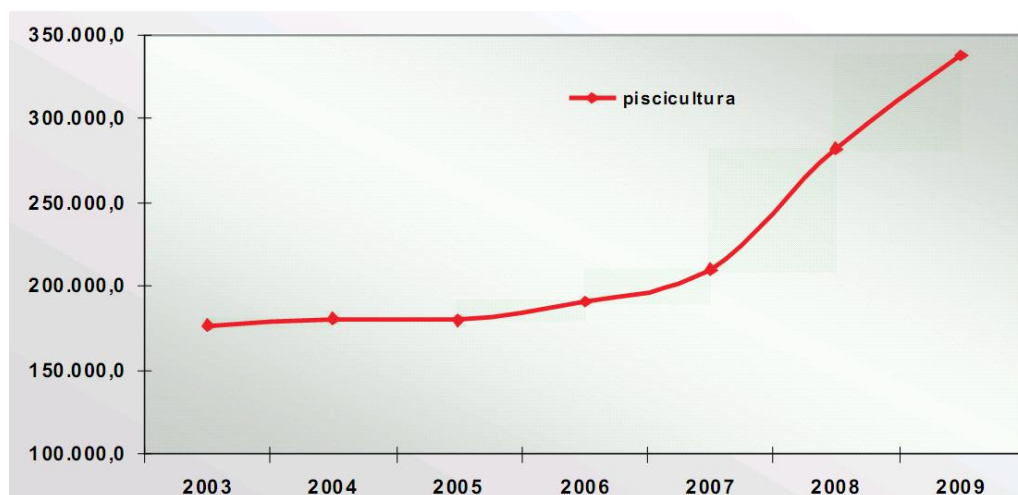


Figura 3 – Produção da Piscicultura de 2003 a 2009.

Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura – Estatística 2008 e 2009

Comparando o crescimento da produção das atividades zootécnicas no período de 2007 a 2009, observa-se que a aquicultura registrou uma expressiva evolução, com um crescimento relativo de 43,8%, ao passo que as principais

criações da pecuária nacional, aves e suínos, registraram apenas 12,9% e 9,2%, respectivamente, e a de bovinos uma retração na ordem de 8,6% (Figura 4).

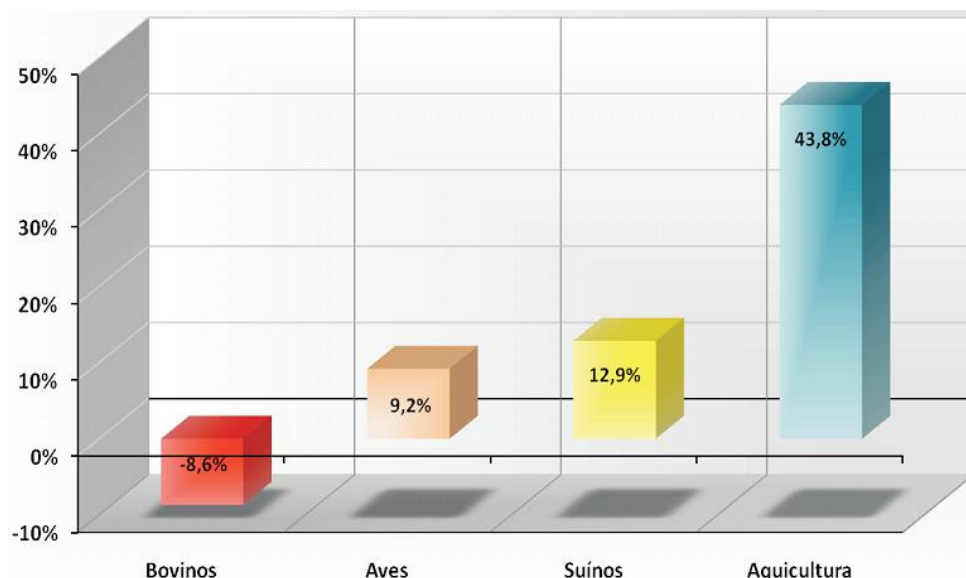


Figura 4 – Crescimento Relativo da Pecuária e Aquicultura 2007 – 2009.
Fonte: Dados de Pecuária IBGE/SIDRA

A figura 5 ilustra a distribuição nacional de pescados por região no ano de 2009, onde a região Nordeste foi a mais produtiva, com 411.463 toneladas de pescados, correspondendo a 34% da produção nacional. O segundo e o terceiro maiores produtores de pescados foram a região Sul e Norte com valores muito próximos, 316.257 toneladas (25%) e 263.814 toneladas (21%) respectivamente. Fechando a lista está a região Sudeste com 177.249 toneladas (14%) e a Centro-oeste com 72.030 toneladas (6%).

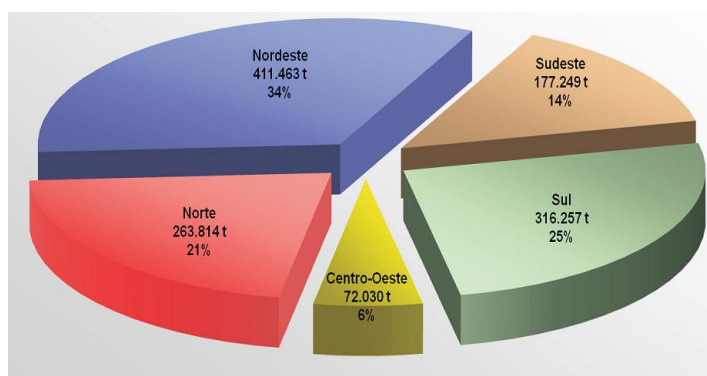


Figura 5 - Produção Nacional de Pescados em 2009 por Região.
Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura – Estatística 2008 e 2009.

A distribuição Nacional de pescados (pesca extrativa e aquicultura) por Unidade de Federação no ano de 2009, aponta o estado de Santa Catarina em

primeiro lugar, com 207.505 toneladas, seguido pelo Pará com 135.228 toneladas e a Bahia com 119.601 toneladas (Figura 6). O Distrito Federal com 1.308 toneladas registrou a menor produção do país. Segundo dados da FAO (2009) a aquicultura continental teve um crescimento relativo de 6,4%.

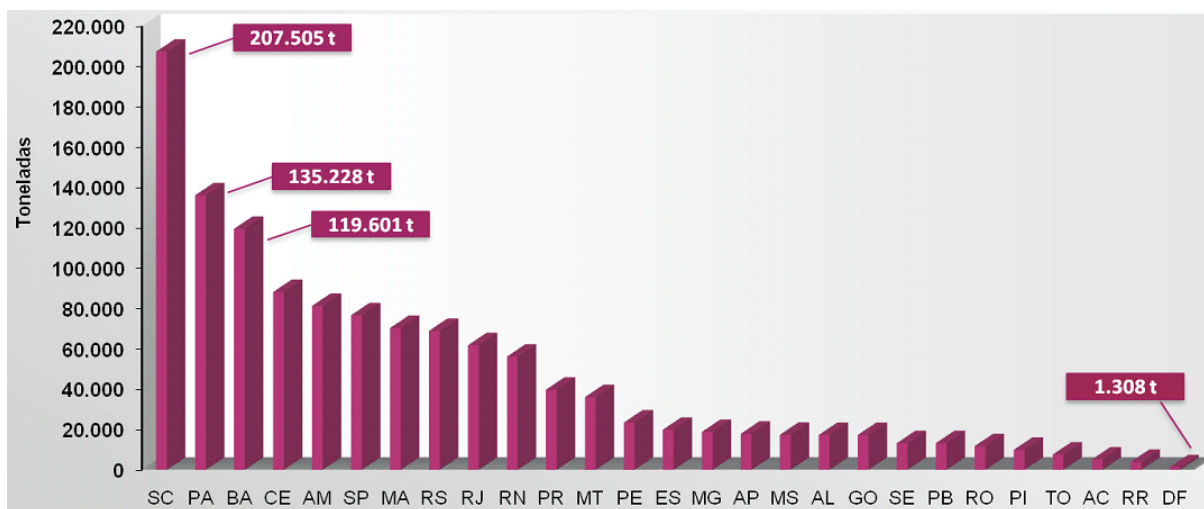


Figura 6 – Produção Nacional de Pescado em 2009 por Unidade de federação.
Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura – Estatística 2008 e 2009.

3.1.1.1 Produção de Tilápia no Brasil

A produção de Tilápia no Brasil apresenta um padrão de crescimento contínuo desde 1994. Entre os anos de 2003 a 2009, a produção cresceu 105%, saindo de 64.857,5 toneladas para 132.957,8 toneladas, respectivamente e representa 39% do total do pescado proveniente da piscicultura continental no país.

Os maiores aumentos de produção foram em 2002, quando houve um acréscimo de 59% em relação a 2001 e, em 2007, quando a produção aumentou 33% em relação ao ano anterior. (Figura 7)

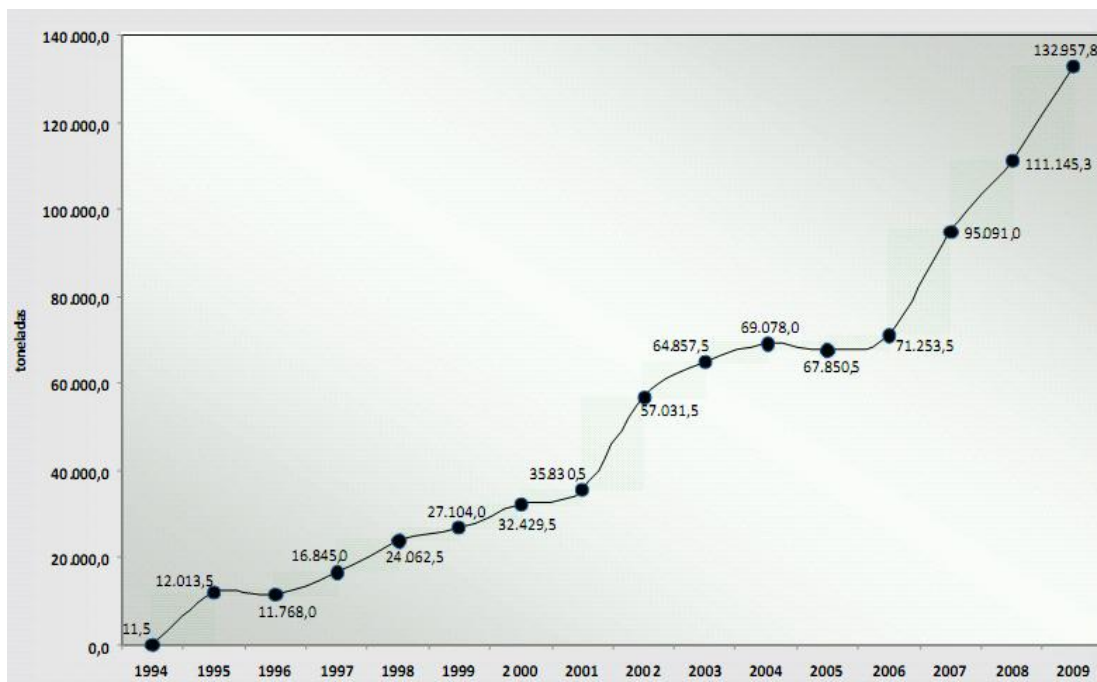


Figura 7 – Produção de Piscicultura (Tilápia) no período de 1994 a 2009.
Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura – Estatística 2008 e 2009.

Entre 2006 e 2009, a produção aumentou 86%, chegando a ultrapassar 130.000 toneladas. É importante ressaltar que do ano de 2008 para 2009 houve crescimento de 20% da produção, chegando a 132.957,8 toneladas.

3.2 Biologia da Tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Há vinte anos atrás, todas as Tilápias de importância comercial eram agrupadas em um único gênero, *Tilápia spp.* Na década de 70, as espécies que incubavam seus ovos na boca foram separadas daquelas que incubavam seus ovos externamente e foram classificadas como sendo todas do gênero *Sarotherodon*; e em 1983, as espécies do gênero *Sarotherodon* foram novamente divididas, separando as espécies que incubam os ovos na boca da fêmea sob o gênero *Oreochromis* (LEONHARDDT, 1997).

Uma classificação taxonômica recente publicada por POPMA e LOVSHIN (1996), classifica a Tilápia de importância comercial em três grupos taxonômicos, os quais são distintos pelo comportamento reprodutivo. São eles as do gênero *Tilapia spp.*, que incubam seus ovos em substratos; *Oreochromis spp.*, que incubam os ovos na boca da fêmea; e *Sarotherodon spp.*, que incubam os ovos na boca do macho ou de ambos.

A Tilápia é típica de ambiente tropical, adaptando-se melhor em clima onde a temperatura da água varie entre 18 °C e 28 °C. Temperaturas abaixo de 12 °C e acima de 42°C são letais. A desova é estimulada com temperatura da água entre 22°C e 24°C. Segundo CASTAGNOLLI (1992), o melhor desempenho da Tilápia é obtido com a temperatura da água entre 26°C e 28 °C e, quando esta é inferior a 15 °C, pouco se alimenta e não se reproduz.

Segundo estudos de BALARIN e HATTON (1979), a Tilápia apresenta sua distribuição geográfica natural no Leste Africano (bacia do rio Nilo), no Congo e no Oeste Africano (bacias dos rios Níger e Senegal), sendo, a partir daí, disseminada pelo homem para Israel, Sudoeste Asiático (Indonésia, Filipinas, Formosa), para o EUA (Alabama e Flórida) e, ainda, para a América do Sul (Brasil, México e Panamá).

A Tilápia do Nilo foi introduzida inicialmente no Brasil pelo Estado do Ceará, através do D.N.O.C.S. (Departamento Nacional de Obras Contra a Seca), em Pentecostes, em 1971, procedente da Costa do Marfim, África. Por ser oriunda da bacia do rio africano, recebeu o nome Tilápia do Nilo (GALLI e TORLONI, 1986).

Com o objetivo de aumentar a produção brasileira de Tilápia, foram introduzidas três linhagens no país, a Chitralada, importada em 1996 pela Associação de produtores de alevinos do estado do Paraná sendo proveniente da Costa do Marfim, (MOREIRA et al., 2000), a Supreme, em 2004 introduzida pela Larvicultura Aquabel que foi desenvolvida pela empresa Norueguesa Genomar e a GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), que em 2005 foi recebida pela Universidade Estadual de Maringá proveniente da Malásia desenvolvida pela *World Fish Center*. Segundo o Panorama da Aqüicultura (2007) estas introduções contribuíram significativamente com a expansão da tilapicultura no Brasil.

Oreochromis niloticus é um peixe facilmente reconhecido por apresentar listras verticais na nadadeira caudal, escamas grandes, pouco brilhantes, coloração metálica, manchas esbranquiçadas no ventre, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas (Figura 10) e, quando alevinos, um colorido metálico em tom verde-azulado na cabeça (GALLI e TORLONI, 1986; LUND). (Figura 9)



Figura 8 – Larvas de Tilápia (4dpf) – Linhagem Supreme
Fonte: Laboratório de Engenharia Genética Animal, da
Universidade Federal de Pelotas, RS - Brasil.



Figura 9 – Alevinos de Tilápia (38 dpf) – Linhagem Supreme.
Fonte: Laboratório de Engenharia Genética Animal, da
Universidade Federal de Pelotas, RS - Brasil.



Figura 10 – Tilápia adulta – Linhagem Supreme.
Fonte: Decca Indardeka Life and Adventure.

Na natureza, a Tilápia do Nilo chega à sua primeira maturação sexual a partir de 20 cm. Já em cativeiro pode atingi-la com quatro a cinco meses de vida e com 10 a 17 cm de comprimento e pode pôr de 1.500 a 2.000 ovos por vez, desovando pelo menos três vezes ao ano (KUBITZA, 2000).

Uma característica da reprodução desta espécie é o fato de a fêmea incubar os ovos na boca, onde permanecem por sete a oito dias, só saindo após a absorção do saco vitelino, o que dá uma proteção à prole e apresenta uma média de peso inferior à dos machos, cerca de 50 a 70%. Este fato, aliado à precocidade sexual e a característica de se reproduzirem durante todo o ano em locais de temperatura alta, garante uma grande disponibilidade de alevinos desta espécie para o cultivo (LUND e FIGUEIRA, 1989). Ao atingir a maturidade sexual, desvia sua energia para a reprodução e cuidado parental, devido à alta prolificidade, acaba gerando superpopulação nos ambientes de cultivo (KUBITZA, 2000) e competição por espaço e alimento (CARVALHO e FORESTI, 1996) causando uma redução da taxa de crescimento e até a mortalidade devido à depreciação da qualidade da água.

3.3 Reversão sexual

Com o objetivo de solucionar o problema reprodutivo e o fato dos machos apresentarem taxa de crescimento superior às fêmeas (TACHIBANA et al., 2004), diversas técnicas vêm sendo implantadas. Foram criadas técnicas, baseadas na manipulação direta e indireta do sexo fenotípico dos peixes, baseadas na eliminação das fêmeas dos ambientes de cultivo a partir de reversão sexual por tratamentos hormonais e manipulação genética ou ambiental.

Segundo Yamamoto (1969), para que ambos os métodos sejam efetivos, os tratamentos devem começar antes do início da diferenciação sexual.

3.3.1 Métodos diretos de reversão sexual

Os métodos diretos atuam sobre os processos fisiológicos que determinam masculinização, feminilização ou esterilização. Estes métodos são os mais difundidos e utilizados, como por exemplo, o uso de hormônios esteróides androgênicos (POPMA e LOVSSHIN, 1996; BEADMORES et al., 2001) que visa eliminar ou minimizar a reprodução nos tanques, alcançar uma maior produção, devido ao melhor crescimento dos machos, e obter uma maior uniformização dos lotes. Entretanto, o uso de hormônios na produção animal tem sido questionado em qualquer fase de criação, dosagem ou tempo de utilização em animais destinados ao consumo humano. Assim, buscam-se alternativas influenciadas pela preocupação dos consumidores com os efeitos residuais dos hormônios esteróides no meio ambiente e na saúde humana (OLIVEIRA et al., 2008).

Conforme mostra a figura 11, o genótipo determina o gene responsável pela expressão da proteína, a qual irá atuar na determinação do sexo genotípico e fenotípico. Tem-se assim dois caminhos, na determinação de fêmeas, o gene *CYP19a1a* expressa uma proteína, a aromatase (*CYP19a1a*), que catalisa a desnaturação (aromatização) do anel A dos androgênios (C19) e converte-os em estrogênios (C18). Neste processo, o *metil* 19 é removido e esta enzima é ligada a membrana, localizada no retículo endoplasmático das células produtoras de estrógeno dos ovários, placenta, testículos e tecidos adiposos e encefálicos. A aromatase é codificada pelo gene *CYP19a1a* e atua na formação do complexo *nadph-ferri-hemoproteína redutase* no sistema do citocromo *P-450*. Outro caminho é

a determinação de machos, ou seja, quando o gene *CYP19a1a* por algum motivo não é expressado, a proteína não é codificada e inicia a formação testicular. Os quatro métodos diretos podem ser utilizados na uniformização de lotes (tanto para machos quanto para fêmeas). Para reversão de fêmeas genotípicas em machos fenotípicos, o método comumente utilizado é a incorporação de hormônios esteróides na ração (POPMA e GREEN, 1990; PHELPS e POPMA, 2000). O hormônio mais utilizado neste processo, provavelmente devido a seu potencial androgênico, facilidade de obtenção e baixo custo, é o andrógeno sintético *17 α* metiltestosterona (PHELPS e POPMA, 2000), um derivado metilado da testosterona (PIFERRER e DONALDSON, 1991). Há também os inibidores enzimáticos, conforme mostra a figura 11, onde estes são compostos não esteróides que não interferem no metabolismo dos hormônios esteróides endógenos, nem antes e nem durante o período de diferenciação sexual, são semelhantes aos substratos específicos da aromatase (testosterona e androstenediona), geram uma competição pelo sítio ativo da enzima, como por exemplo, o Fradozol, Letrozol, Anastrozol e Vorozol (BOMBARDELLI et al., 2004).

Os receptores antagônicos de estrogênio (Figura 11), são compostos antiestrógenos que impedem a produção dos estrógenos, são utilizados como um método de reversão sexual, pois se ligam aos receptores intranucleares específicos dos hormônios esteróides, não permitindo assim a produção de estrogênio, levando ao desenvolvimento de testículos (LEHNINGER et al., 1995).

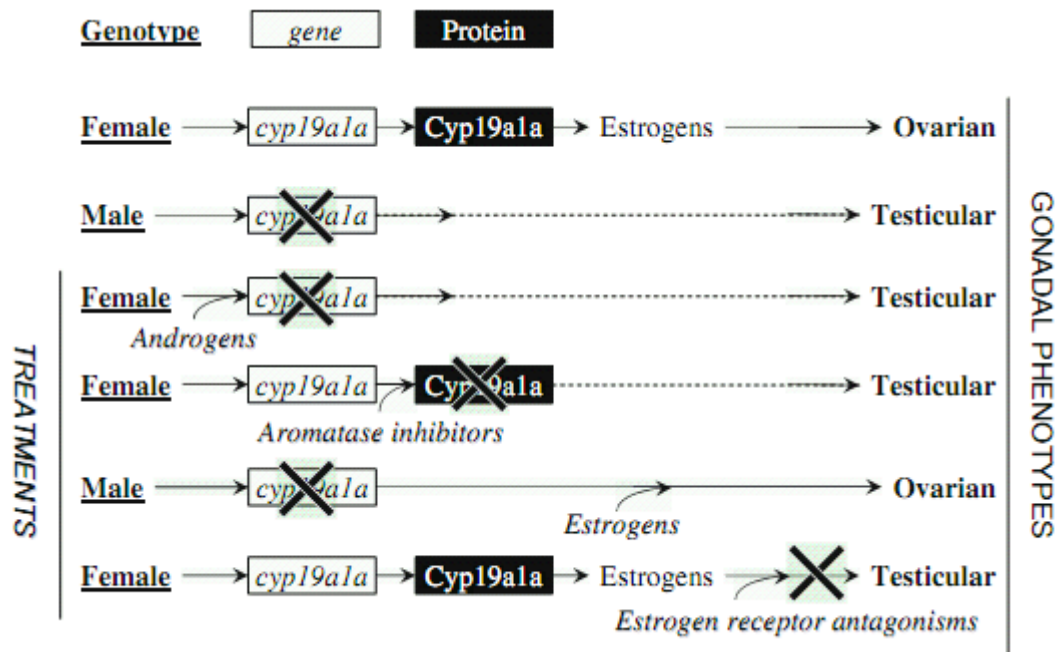


Figura 11 – Esquema de determinação do sexo e de tratamentos direto de reversão sexual (GUIGUEN et al., 2010).

3.3.2 Métodos indiretos de reversão sexual

Segundo Donaldson (1996), os tratamentos indiretos atuam diretamente sobre processos genéticos ou variáveis ambientais, os quais influenciarão indiretamente os processos fisiológicos que determinam o sexo fenotípico.

Segundo Baroiller (1995), a determinação do sexo é predominantemente determinada pela existência de um grande gene localizado em um par de cromossomos sexuais. Em Tilápias, como na maioria dos peixes teleósteos, as relações de sexo são influenciadas por certos fatores exógenos específicos, como a temperatura.

Além disso, a diferenciação sexual requer uma variedade de vias bioquímicas envolvendo muitas proteínas diferentes, como por exemplo, fatores de transcrição, enzimas, receptores, sistemas de segundo mensageiro, e outros. (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002), e como a temperatura pode influenciar grandemente na estrutura e função destas moléculas, a reversão sexual por temperatura vem sendo estudada por vários pesquisadores como método alternativo ao tratamento hormonal (BARAS et al., 2000; WANG e TSAI, 2000; BARAS et al., 2001; TSAI et al., 2003; AZAZA et al., 2008). Esses estudos fornecem evidências de que a temperatura

baixa da água (~25°C) favorece a diferenciação sexual feminina enquanto que a temperatura alta (~35°C) favorece a diferenciação sexual masculina.

3.3.3 O uso da temperatura como alternativa de Reversão Sexual

Recentemente, tem sido destaque que o aumento da temperatura, invariavelmente, resulta em um aumento no número de machos de espécies de peixes termossensível (OSPINA-ÁLVAREZ e PIFERRER, 2008).

Em um estudo subsequente Yamaguchi et al., (2007) e Wang et al., (2007), encontraram o mesmo padrão de expressão de *cyp19a1a*, correlacionou-se com a do fator de transcrição *FOXL2*, que é conhecido por ser um potente ativador transcricional de *cyp19a1a*. Juntos, esses resultados indicaram que a exposição à alta temperatura durante o período termossensível suprimiu a expressão do gene *cyp19a1a* nestas espécies de peixes termossensíveis, que presumem ser resultado da baixa atividade da aromatase e, por sua vez, baixos níveis de E2.

Assim, a falta de estrogênio causa expressão gênica suprimida da aromatase, torna-se responsável pela masculinização de fêmeas genéticas quando os peixes são expostos a alta temperatura (SOCORRO et al., 2007).

No entanto, parece improvável que a aromatase seja um alvo direto da temperatura e, portanto, a base do mecanismo de ligação da temperatura ambiente e da expressão de *cyp19a1a* permanece desconhecida, embora os dados mais recentes da indústria européia de robalo sugerem que os efeitos da alta temperatura pode ser mediada por metilação dos sítios CpG no promotor específico *cyp19a1a* (PIFERRER et al., 2008).

Até agora, poucos experimentos foram realizados para estudar o efeito da temperatura da água na proporção sexual em peixes.

Em truta arco-íris, experimentos realizados por Van den Hurk e Lambert (1982) e Baroiller et al. (1999), não encontraram nenhum efeito da temperatura sobre a proporção entre os sexos.

Alta repetibilidade da resposta à reversão do sexo, com tratamentos de temperatura, só foi comprovada em Tilápias (*Oreochromis niloticus*) por Tessema et al. (2006). Além disso, o estudo de Magerhans et al. (2009) fornece evidências de que ambos, machos e fêmeas, contribuem para as diferentes proporções sexuais após o tratamento com temperatura.

O modo de ação da temperatura sobre a diferenciação sexual, durante a embriogênese, é um processo que ainda não é compreendido. Tem sido provado que as temperaturas elevadas regulam a expressão do gene da aromatase, ou de fatores de transcrição responsáveis pela expressão do gene durante a diferenciação sexual em peixe (BAROILLER e D'COTTA, 2001; D'COTTA et al., 2001; TSAI et al., 2003). Uma hipótese é que a alta temperatura pode atuar diretamente no gene da aromatase cerebral (*CYP19b*) para modificar o caminho da diferenciação sexual durante a embriogênese.

Esta hipótese de "sexualização de cérebros" é consistente com a presença de um rudimento cerebral 31h pós-fertilização em Tilápia do Nilo (MORRISON et al., 2001). Segundo Francis (1992) e Arnold (2004) a idéia é de que a diferenciação sexual ocorre no cérebro antes de ocorrer na gônada. Na Tilápia do Nilo, o início da expressão de ambos os genes da aromatase se estabelece entre três e quatro dias pós-fertilização (KWON et al., 2001).

Em *Oreochromis mossambicus*, Tsai et al. (2003) observaram que a expressão tanto da aromatase cerebral quanto dos receptores de estrogênio, foi diferencialmente regulada de acordo com a temperatura, e o período de desenvolvimento sugeriu uma relação com a diferenciação sexual do cérebro.

No Alabote do Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*), Matsuoka et al. (2006) também observaram maiores níveis de expressão do gene da aromatase no cérebro em um estágio de desenvolvimento anterior ao das gônadas, e sugeriram que a diferenciação sexual pode começar no cérebro antes da diferenciação gonadal.

Ovidio et al. (2002) observaram que pseudofêmeas ZZ de *Oreochromis aureus*, obtidas por reversão sexual, com tratamento de hormônios durante o período larval, foram mais agressivas que fêmeas normais (ZW), e sugeriram que pode haver pseudofêmeas desenvolvendo um cérebro masculino durante a fase embrionária. Todos esses resultados sugerem que a diferenciação sexual em Tilápia pode ocorrer durante os primeiros estágios embrionários, bem como a existência de um possível papel do cérebro na diferenciação do sexo gonadal. Outra hipótese é que a alta temperatura, aplicada durante o desenvolvimento embrionário, age diretamente sobre as células somáticas das futuras gônadas e / ou sobre as células germinativas, que já estavam presentes 46 hpf (horas pós fecundação) em embriões criados a 27°C - 29°C (MORRISON et al., 2001).

3.4 Genes da cascata genômica envolvidos na diferenciação e na determinação sexual

3.4.1 Gene *CYP19*

O gene *CYP19* codifica proteínas enzimáticas que tem nas suas seqüências cerca de 60% de homologia umas com as outras. A enzima-chave para equilibrar a relação dos hormônios esteróides é a *CYP19* aromatase (que é a enzima terminal no caminho da esteroidogênese). A expressão adequada desta enzima é essencial para diferenciação do sexo e para reprodução em animais vertebrados (CHANG et al., 1995).

Usando hibridização *in situ*, Harvey et al. (2003) demonstraram que em Tilápia (*Oreochromis niloticus*) o gene *CYP19* está localizado em cromossomos diferentes.

Estudos demonstraram que isoformas da aromatase têm distribuição divergente nos tecidos, na resposta ao estrogênio exógeno e no padrão de expressão durante a ontogenia das gônadas (WANG, 2005). A Aromatase citocromo P450 (*P450arom*; *CYP19*) é um produto do gene *CYP19*, uma enzima terminal na via de biossíntese de estrogênio e que catalisa a transformação de androgênio em estrogênio. O estrogênio é essencial para o desenvolvimento gonadal e outros diversos processos fisiológicos, que vão desde o crescimento normal ao comportamento reprodutivo. A aromatase, que se expressa principalmente no ovário foi designada *CYP19a* / *P450aromA* / *CYP19A1*.

São conhecidos dois tipos de aromatase: cerebral (*CYP19b*) e ovariana (*CYP19a*). A comparação de seqüências de nucleotídeos entre os genes *CYP19* e seus clones de cDNA correspondentes indicam que o *tCYP19a* e *tCYP19b* contêm seqüências que codificam proteínas em 9 éxons, e que as seqüências de DNA nas fronteiras entre éxon / íntron seguem a regra descrita por Breathnach e Chambon (1981). A região de codificação dos éxons de *tCYP19b* têm 50, 71, 65, 64, 70, 65, 79, 67 e 60% de homologia com os éxons correspondentes de *tCYP19a*, embora haja grande diferença nas seqüências de nucleotídeos entre os íntrons (Fig. 7). A similaridade na estrutura genética entre *tCYP19a* e *tCYP19b* apoiou a sugestão de que esses dois genes da aromatase surgiram a partir de um único gene ancestral no início da evolução dos vertebrados (CHIANG et al., 2001).

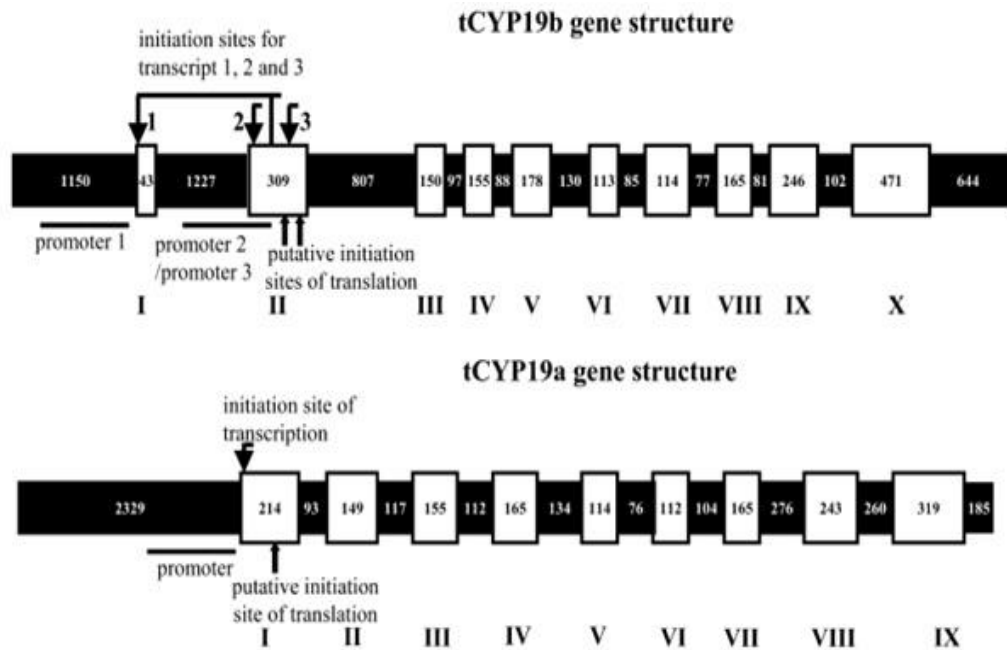


Figura 12 - Desenho esquemático da estrutura do gene *tCYP19b* e *tCYP19a*. Regiões de éxon e íntron são indicados por caixas abertas e sólidas, respectivamente. Os números nas caixas representam o tamanho dos fragmentos. Sítios de iniciação de transcrição e tradução estão marcadas com setas. (CHANG et al., 2005).

Vários fatores de transcrição têm sido identificados nos genes *P450arom* de mamíferos e de arraia do Atlântico (Ijiri et al., 2000), mas não em *CYP19b* de *zebrafish* ou *goldfish*. Usando *Sequence Motif Search* ([http:// motif.genome.ac.jp](http://motif.genome.ac.jp)), *TFSEARCH* ([http://www.cbrc.jp/ investigação db / TFSEARCH.html](http://www.cbrc.jp/investigação db / TFSEARCH.html)) e *Dragon ERE Wnder* (<http://sdmc. lit.org.sg/ERE-V2>), que são ferramentas de análise de promotor disponíveis na internet, foram analisadas seqüências promotoras de *tCYP19* para diversos fatores de transcrição: fator de transcrição esteroideogênico - *1/Ad4 BP* (*SF-1/Ad4*), o elemento de resposta do *AMPc* (*CRE*), fator de transcrição *GATA 4* (*GATA-4*), *Wilm* (*WT1-KTS*), o *SRY*, o *CRE*, o *ERE* (estrogênio) e o *RAR-2* relacionados a regiões de ligação (*RORα/p*). Estas diferenças na estrutura promotora sugere que a expressão dos dois genes *tCYP19* é regulada por fatores de transcrição divergentes.

A análise da estrutura do promotor de isoformas da aromatase aponta o papel decisivo do *CYP19* para a diferenciação sexual de teleósteos. Estudos indicam que geralmente *SRY*, *GATA-4*, *WT1-KTS*, e *SF-1* são genes de mamíferos envolvidos na determinação do sexo e são fundamentais para o início da cascata de diferenciação sexual (PARKER et al., 1999).

Em geral, a aromatase gonadal *cyp19a1a* é mais abundante do que a aromatase encontrada no cérebro (*Cyp19a1b*). A expressão dos dois genes *CYP19* já foi investigado no período de 0 a 41 dias após a fertilização (DPF), que é o tempo esperado de determinação e diferenciação do sexo em *zebrafish*. A expressão de *cyp19a1a* foi maior após a eclosão de 4 a 8 DPF. O padrão de expressão de *cyp19a1b* foi segregado em duas populações, sugerindo uma associação com a diferenciação sexual (TRANT et al., 2001).

3.4.1.1 Gene *CYP19a* – Aromatase ovariana

Em 1995, Corbin isolou uma isoforma funcional da aromatase de ovário suíno que apresentou 87% de homologia de aminoácidos já conhecidos, clonados de placenta. Pouco tempo depois, uma terceira isoforma da aromatase foi isolada em suínos (Choi et al., 1996). Estas isoformas de aromatase mostram especificidade de substrato, de nível de expressão da atividade enzimática e do modo de regulação, o que implica no papel que desempenham em diversos eventos reprodutivos (CHOI et al., 1996; GRADDY et al., 2000).

Múltiplas formas de aromatase também foram encontradas em teleósteos incluindo *goldfish*, *zebrafish* e *robalo* (BLAZQUEZ e PIFERRER, 2004; CHIANG et al., 2001; GELINAS et al., 1998; e KISHIDA e CALLARD, 2001; TCHOUDAKOVA e CALLARD, 1998; TONG et al., 2001). Segundo Chang (2005), a *tCYB19a* só foi detectada no ovário de filhotes de 15, 20, 25 e 35 dias de idade.

O *Northernblot* e o RT-PCR detectaram uma transcrição de *tCYP19a* seletivamente elevada no ovário de Tilápia durante a vitelogênese. Estes resultados são consistentes com os padrões previamente observados na expressão dos genes *CYP19* em *zebrafish*, *goldfish* e *robalo* (WANG et al., 2010).

Diversos estudos confirmam que o estrogênio é necessário para diferenciação do ovário (KOBAYASHI et al. 2003, KWON et al., 2000). É possível que o nível de expressão do gene *CYP19a* controle a determinação do sexo através da regulação da síntese de estrogênio em teleósteos (KOBAYASHI et al. 2003).

O elevado nível de expressão de *CYP19a* no ovário é consistente com os altos níveis de atividade da aromatase *P450* e a produção de *17 β estradiol*, que têm sido observados em folículos de teleósteos durante a vitelogênese (TRANT et al., 2001).

Em *zebrafish*, o gene *CYP19a*, é expresso principalmente em células foliculares durante a vitelogênese (CHIANG et al., 2001; TRANT et al. , 2001). Da mesma forma, em *goldfish* e *robalo* o *CYP19a* só foi expresso em níveis elevados no ovário durante a vitelogênese (BLAZQUEZ e PIFERRER, 2004; GELINAS et al., 1998; TCHOUDAKOVA e CALLARD , 1998).

Pesquisas indicam que *CYP19a* desempenha um papel fundamental no crescimento do ovário.

Com base na localização de *TATA box*, tampando os sinais e os sítios de iniciação da transcrição, é possível deduzir um possível promotor para o gene *tCYP19a* (CHANG et al., 2005).

Com *Northernblot*, Yoshiura et al., (2003) demonstraram expressão paralela de *tCYP19a* e do fator de transcrição *SF-1/Ad4BP* durante o crescimento do ovário, e mostraram que os níveis de HCG são simultaneamente estimulados pelos níveis de mRNA de *tCYP19a* e *SF-1/Ad4BP* no crescimento dos folículos, sugerindo que *CYP19a* regula a expressão de gonadotrofina através da modulação do *SF -1/Ad4*.

Kwon et al., (2001) observaram uma alta expressão de *tCYP19a* em Tilápia fêmea durante diferenciação sexual precoce, e descobriram que a expressão de *tCYP19a* diminui drasticamente em machos entre 15 e 27 dias após a eclosão.

A inibição da *CYP19a* em indivíduos teleósteos machos pode levar a gônada bi-potencial a se transformar em um testículo. Em contraste, nas fêmeas, a sub-regulação de genes responsáveis pela determinação sexual desregula a expressão de *CYP19a*, que leva à alta produção de estrogênio e, assim, desencadeia o desenvolvimento dos ovários. Além disso, alguns estudos têm relatado que o estrogênio pode inversamente inibir a expressão dos genes determinantes do sexo. Em um estudo em tartaruga (*Trachemys scripta elegans*) e com truta, Crews et al., (2001) observaram que o tratamento com estrógeno, de forma direta ou indireta reprime o *SF-1* causando o desenvolvimento de alevinos em fêmeas, e que a inibição da produção de estrogênio causada pela *up*-regulação do *SF-1* leva ao desenvolvimento de alevinos em machos.

3.4.1.2 Gene *CYP19b* – Aromatase cerebral

A aromatase cerebral designada *CYP19b/P450aromB/CYP19A2* é expressa em um alto nível no cérebro e é fortemente induzida pelo estrogênio. Em 1997

Chang et al., através de um cDNA obtido a partir de tecido ovariano de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) descreveu a aromatase cerebral. A enzima é expressa em alto nível no tecido cerebral e é altamente homóloga à *CYP19b* de *goldfish* e *zebrafish*, sendo designada em Tilápia *tCYP19b*.

Segundo Chang (2005) parte da sequência de *tCYP19b* apresenta 63,8% de homologia global com *tCYP19a* e 65,2; 68,1; 69,5; 66,6; 65,9; 66,3; 63,8 e 83,6% de homologia com a aromatase de *catfish*, *CYP19b* de *goldfish*, *CYP19a* de *goldfish*, aromatase de *medaka*, *CYP19b* e *CYP19a* de *zebrafish*, *CYP19b* de *robalo*, respectivamente (BLAZQUEZ e PIFERRER, 2004; CHANG et al., 1997; GELINAS et al., 1998; KISHIDA e CALLARD, 2001; TCHOUDAKOVA e CALLARD, 1998). A sequência de *tCYP19b* também compartilha 57,3, 54,3, 53,1, 53,8, 54,6 e 54,3% de homologia com aromatases de *Xenopus*, galinha, rato, placenta humana, placenta de suíno e ovário suíno, respectivamente (TERASHIMA et al., 1991).

Através de *RT-PCR* Chang (2005) detectou em *tCYP19b* a expressão de duas isoformas da *P450arom* durante a diferenciação sexual em todos os tecidos do cérebro coletados a partir de 1, 10, 15, 20, 25 e 35 dias de idade e nas gônadas, de 15, 20, 25 e 35 dias de idade, onde não houve divergências significantes entre os sexos. Estes resultados sugerem que *tCYP19b* é expresso em altos níveis no cérebro e é expresso em níveis baixos em outros tecidos.

Os altos níveis de mRNA detectados através de *RT-PCR* em *CYP19b* no tecido cerebral de teleósteo sugere que o gene está envolvido na produção de neuroestrogênio no cérebro.

Segundo Wang (2005), com base na localização de *TATA box*, tampando os sinais e os sítios de iniciação da transcrição, é possível deduzir três possíveis promotores para o gene *tCYP19b*. Os promotores 1 e 2 de *tCYP19b* estão localizados na região 5' terminal dos éxons I e II, respectivamente, sugerindo que eles estão envolvidos na expressão de regulação da transcrição 1 e 2 respectivamente. O promotor 3 está localizado no meio do éxon II, sugerindo que ele está envolvido na iniciação da transcrição 3. É também possível que o promotor 2 regule a transcrição de ambos 2 e 3, com *splicing* alternativo produzindo as transcrições divergentes.

No entanto, ao investigar a expressão de aromatase em embriões e juvenis de *zebrafish*, Kishida e Callard (2001) e Trant et al., (2001) enfatizaram o importante papel da *CYP19b* para diferenciação sexual das gônadas. Dois grupos relataram

que estradiol, etinilestradiol e 17-metiltestosterona poderiam aumentar a produção de mRNA de *CYP19b* em embriões de *zebrafish*.

Blazquez e Piferrer (2004) também relataram que a expressão de *CYP19b* foi aumentada no cérebro dos machos de *robalo* após a diferenciação sexual (200 - 250 dias após a fecundação). Esses resultados sugerem que *CYP19b* está profundamente envolvida na diferenciação sexual da espécie.

Por outro lado, a presença de *ERE* na região promotora do gene *CYP19b* sugere que o efeito do estrogênio exógeno sobre o desenvolvimento das gônadas, pelo menos parcialmente, ocorre através de *up*-regulação da expressão de *CYP19b*. Assim, Kishida e Callard (2001) e Trant et al., (2001) observaram o aumento da expressão de *CYP19b* em embriões de *zebrafish* após o tratamento com estrogênio. A elevação de expressão de *CYP19b* pelo estrogênio exógeno tem o mesmo efeito que a alta expressão natural de *CPY19a* em condições fisiológicas, na ontogênese do ovário.

Além da alta expressão de *CYP19b* no período de diferenciação sexual e no período posterior a diferenciação do sexo, que foi observado em *zebrafish* e *robalo*, implica que a ativação do gene *CYP19b* é uma consequência de determinação do sexo e a sua expressão está, possivelmente, envolvida no desenvolvimento das gônadas após a diferenciação (BLAZQUEZ e PIFERRER, 2004; KISHIDA e CALLARD, 2001a; Trant et al., 2001). Além disso, Kishida e Callard (2001), Trant et al. (2001).

Blazquez e Piferrer (2004) também relataram que os níveis de mRNA de *CYP19a* é muito maior do que a de *CYP19b* na diferenciação sexual precoce de *zebrafish* e de *robalo*.

Em contraste, Goto-Kazeto et al., (2004) investigaram a alta e a baixa expressão de *CYP19a2* (a forma cerebral) e constataram que não há correlação com o sexo na idade adulta em *zebrafish*. Além disso, outro estudo sobre a expressão de *CYP19a1b* no cérebro de *zebrafish* adulto mostrou que os níveis de expressão foram os mesmos tanto em machos quanto em fêmeas (SAWYER et al., 2006).

3.4.2 Gene *Dmrt1*

Dmrt1 (*Doublesex-and Mab-3-related transcription factor-1*) é um fator de transcrição que se expressa unicamente em gônadas XY, (Figura 13) na linhagem das células de Sertoli, antes de qualquer diferenciação sexual e é essencial para que ela ocorra. O *Dmrt1* tem sido clonado em uma variedade de invertebrados, incluindo peixes, crocodilos, tartarugas e aves. Em cada um, a expressão embrionária do *Dmrt1* ocorreu de uma maneira sexualmente dismórfica, onde altos níveis foram observados na gônada masculina em desenvolvimento antes da diferenciação sexual (LEI e HECKERT, 2004).

Em diversas espécies incluindo sapo, jacaré, truta, pássaros e rato, o gene *Dmrt1* é expresso em altos níveis nos machos quando comparados com as fêmeas, sugerindo que a alta expressão é necessária para a diferenciação testicular, enquanto que a baixa expressão é compatível com a diferenciação do ovário (RAYMOND et al., 2000).

A expressão de *dmrt1* no início do período de diferenciação sexual pode indicar que o gene está envolvido na cascata de sinalização do início da determinação e da diferenciação do sexo em *zebrafish*. Em um modelo recente de desenvolvimento gonadal em *medaka*, foi detectada a expressão de *dmrt1* a partir de 10 dph sendo, assim, o primeiro gene a ser diferencialmente expresso em machos e fêmeas (KUROKAWA et al., 2007).

Segundo estudos de Guan et al., (2000) o *Dmrt1* foi expresso no testículo de machos normais XY bem como em machos XX, indicando que o *Dmrt1* é um gene não ligado ao Y cuja expressão é correlata com a formação testicular. Estes autores levantam a hipótese de que em machos um sinal do cromossomo Y (genes regulatórios) atua no *Dmrt1* para promover a formação do testículo. Nos machos XX, influências ambientais ou hormonais parecem compensar a ausência de um sinal do cromossomo Y o que resulta em reversão sexual de XX e uma *up-regulação* da expressão de *Dmrt1*.

O gene *Dmrt1* provavelmente tem um papel a jusante no evento de determinação do sexo e pode estar envolvido no desenvolvimento dos testículos em peixes teleósteos, onde é análogo ao seu suposto papel em algumas espécies de mamíferos. Trabalhos com *medaka* indicam que *Dmrt1* regula a diferenciação das espermatogônias (KOBAYASHI et al., 2004).

Segundo Lei e Heckert (2004) *Dmrt1* é um gene implicado nos estágios tardios da diferenciação embrionária e pós-natal do testículo. Como um fator transcricional, é unicamente expresso no testículo, implicado na cascata de diferenciação testicular, o *Dmrt1* pode ter uma posição chave neste processo genético.

Apesar destes conhecimentos, ainda não se sabe quais são os genes alvo deste importante fator transcricional. Uma super expressão transgênica de *Dmrt1* em peixes XX, resultou na diminuição da expressão do gene da aromatase, reduziu os níveis séricos de *17 β -estradiol*, retardou o desenvolvimento da cavidade ovariana, variando os graus de degeneração folicular, e até uma parcial à completa reversão sexual (Wang et al., 2010). Estes resultados indicam que a aromatase é um dos alvos do *Dmrt1*. Ele suprime o caminho da feminização pela repressão da transcrição do gene da aromatase e a produção de estrogênio nas gônadas de Tilápia e possivelmente de outros vertebrados (Wang et al., 2010).

3.4.3 Gene Sox9

A família de genes *sox* (genes relacionados à *SRY* contendo *HMG*) codifica um importante grupo de reguladores envolvidos no desenvolvimento e na determinação do sexo. O *HMG box* (grupo de alta mobilidade) que caracteriza as proteínas *sox*, é um domínio de ligação com o DNA, e as proteínas codificadas pelos genes *sox* atuam como fatores de transcrição.

SRY é o membro fundador da família dos genes *Sox*, é o determinante cromossômico masculino Y na maioria dos mamíferos (HACKER et al., 1995) . Segundo este autor citado anteriormente, o *Sry* é um gene mal conservado que parece ser exclusivo de mamíferos. Em contraste, o *Sox9* é um gene conservado, presente em todos os tipos de vertebrados. Assim como *Sry*, o gene *Sox9* é necessário para o desenvolvimento do testículo em mamíferos, e a sua deficiência pode resultar na reversão sexual em humanos do sexo masculino.

Em mamíferos a expressão de *Sox9* é vista imediatamente após a de *SRY* e pode ser um efetor a jusante; em ratos o *Sox9* intermedia o início da expressão do *Amh* (*hormônio anti-mulleriano*) nas células de Sertoli (YAO et al., 2004) (Figura 13).

A expressão de *Sox9* durante a diferenciação gonadal é *up-regulado* nos testículos e para *down-regulado* nos ovários de mamíferos, passáros e tartarugas (CHIANG, 2001). No entanto, a organização e a função dos genes da

família Sox é menos compreendida em outros tipos de vertebrados e, apesar da ampla distribuição dos genes Sox9 em peixes, somente alguns têm sido investigados (CHIANG, 2001).

Em gônadas XX e XY de Tilápia, os níveis de expressão de Sox9 foram similares do 9° ao 29° dpf, ficando mais forte logo após em machos XY (IJIRI et al., 2008).

Os resultados de vários estudos sugerem que Sox9 não está envolvido na determinação e diferenciação sexual inicial, mas é necessário para o desenvolvimento dos túbulos testiculares (NAKAMOTO et al., 2006).

3.4.4 Gene *Foxl2*

Foxl2 (*winged helix/forkhead transcription factor gene 2*) é um fator de transcrição, envolvido na diferenciação da gônada e na função ovariana (WANG et al., 2004) em diversos vertebrados (Figura 13). Este gene tem uma expressão ovariana específica em mamíferos, galinhas e truta arco-íris. Em “tartarugas TSD”, uma expressão dimórfica foi vista em gônadas de fêmeas (LOFFLER et al., 2003).

Em Tilápia, o gene *Foxl2* já está se expressando no 9° dpf em gônadas XX, em níveis apenas levemente mais altos que em XY, mas os níveis aumentam linearmente, em seguida, nos ovários XX (IJIRI et al., 2008).

Como em outros vertebrados, o padrão de expressão de *Foxl2* está altamente correlacionado com a expressão de *cyp19a* (IJIRI et al., 2008; BAROILLER et al., 2008). Em Tilápias XX, a expressão de *Foxl2* permanece baixa como em gônadas XY (BAROILLER et al., 2008).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que *Foxl2* se liga ao promotor de *Cyp19a* e ativa sua transcrição (WANG et al., 2007).

É sabido que *Foxl2* está envolvido na diferenciação feminina sustentando linhagens celulares, células da granulosa, e a formação e/ou manutenção dos folículos ovarianos em vários vertebrados (GOVEROUN et al., 2004; LOFFLER et al., 2003; NAKAMOTO et al., 2006; WANG et al., 2004).

3.4.5 Gene *Esr*

Os receptores de estrogênio também são fatores de transcrição, os quais são dependentes de ligação.

Estes receptores regulam a expressão de seus genes alvo tanto diretamente, através de uma ligação específica ao promotor, como por exemplo, a mediação do estrogênio que desempenha um papel regulatório em muitos processos fisiológicos; como indiretamente, via interações com outros fatores de transcrição, como por exemplo o *Sp1* (GUIGUEN, 2010).

3.4.6 Gene *Dax1*

DAX1, membro da família de receptores nucleares é codificado e expresso em gônadas embrionárias de ambos os sexos, mas os níveis de expressão ainda não foram determinados (GUIGUEN, 2010).

3.4.7 Gene *Amh*

O gene *Amh* é um receptor do hormônio anti-Mülleriano (*amhr2*), levando a um aumento no número de células germinativas masculinas e alguns retornos para o sexo feminino (MORINAGA et al., 2007).

3.4.8 Gene *Sf1*

O *Sf1* é um co-ativador, onde junto ao *FOXL2* regula a expressão da *CYP19a* em Tilápia (WANG e NAGAHAMA, 2008).

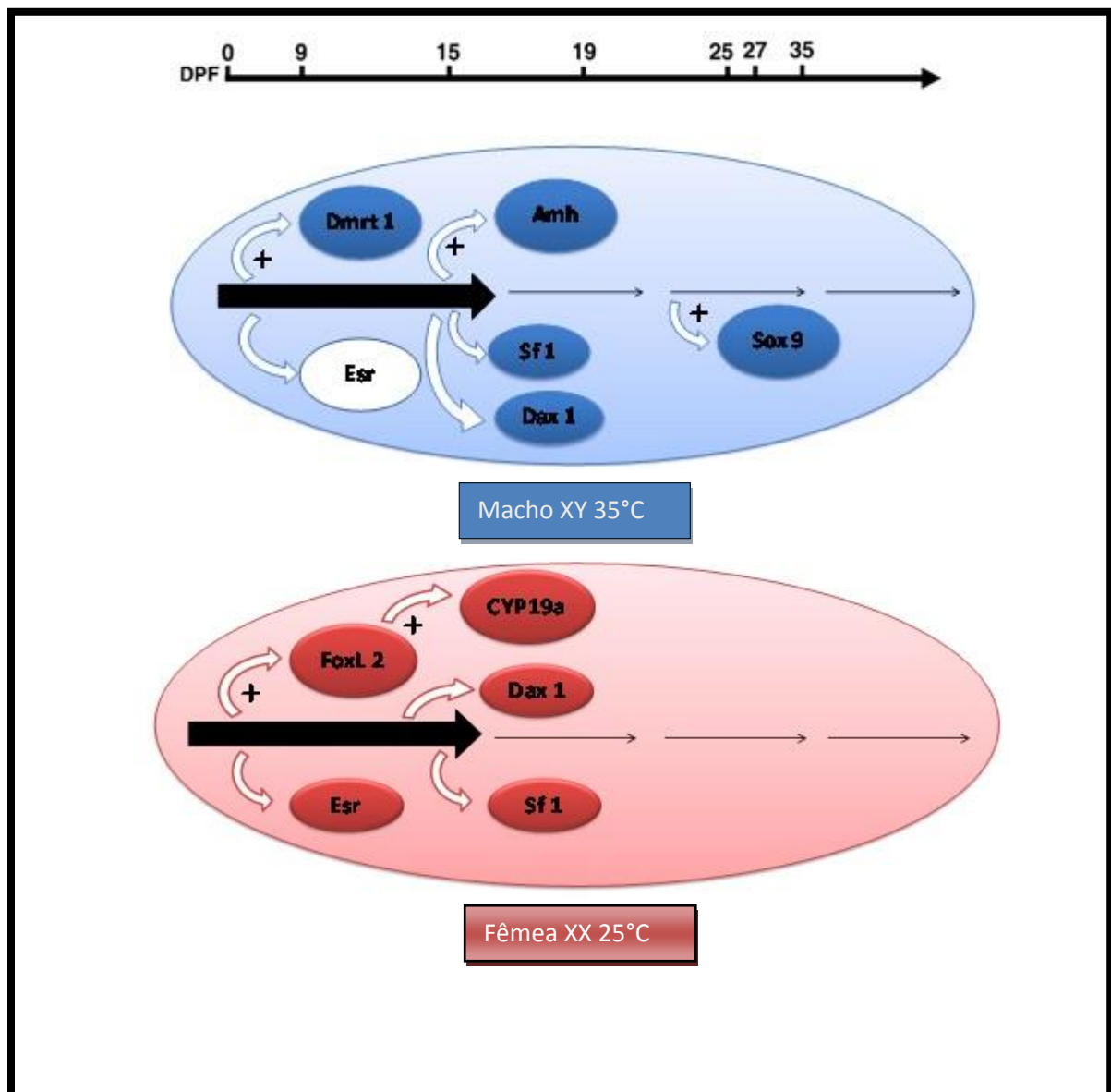


Figura 13 - Esquema dos genes envolvidos no processo de determinação e diferenciação sexual. Adaptado de D'Cotta et al. (2007); Ijiri et al. (2008); Baroiller et al., (2008 e 2009).

A seta grande corresponde ao que é considerado o período crítico da diferenciação sexual. A escala superior representa dias pós-fecundação (DPF). Os círculos brancos são considerados genes de desenvolvimento do ovário, enquanto os círculos azuis são genes que estão relacionados ao desenvolvimento dos testículos. O sinal + significa um aumento da regulação a partir de então.

4. Artigo Submetido à revista Scientia Agraria Paranaensis

PRIMERS MICROSSATÉLITES VALIDADOS EM TILÁPIA DO NILO NO GENE DA AROMATASE CEREBRAL (CYP19B)

MARÍLIA DANYELLE NUNES^{1*}, RAFAEL ALDRIGHI TAVARES², IZANI BONEL ACOSTA³, JANAÍNA CAMACHO DA SILVA⁴, DIONES BENDER ALMEIDA⁵, CARLA GIOVANE ÁVILA MOREIRA⁶, CRISTINA HELENA MARIA MOREIRA VERNETTI⁷, HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA⁸.

RESUMO: A aromatase citocromo P450 é uma enzima que é responsável por um passo chave na biossíntese de estrogênio que está ligado à reprodução. Esta enzima é um produto do gene *CYP19arom* e catalisa a formação de estrogênio a partir de androgênio. O estrogênio é essencial para o desenvolvimento das gônadas e diversos processos fisiológicos, que vão desde o crescimento normal até o comportamento reprodutivo. Este estudo teve como objetivo a validação de *primers* para *locus* microssatélite presente na região regulatória do gene *CYP19b* de *Oreochromis niloticus*. Trinta amostras de três linhagens: Chitralada e Supreme da larvicultura Aquabel e GIFT da Universidade Estadual de Maringá – PR foram analisadas. Após a extração de DNA as amostras foram submetidas a PCR utilizando os *primers* desenhados para flanquear a região microssatélite. Após a confirmação da amplificação as amostras foram submetidas à separação eletroforética no aparato Origins (Elchrom Scientific, USA) para identificação dos alelos. Foi identificado que existe um polimorfismo na região promotora de *CYP19b* nas três linhagens. Observamos três alelos, variando entre 141 e 123 pb. Os *primers* para a amplificação de microssatélite na região regulatória do gene *CYP19b* foram eficientes

e, portanto, seu uso para identificação de mutações nesta região pode ser empregada na análise típica de microssatélite. Os estudos de avaliação desse polimorfismo com a eficiência da reversão por temperatura estão sendo conduzidos.

PALAVRAS-CHAVE: peixe, polimorfismo, reversão sexual

MICROSATELLITE PRIMERS VALIDATED IN NILE TILAPIA BRAIN AROMATASE GENE (*CYP19B*)

ABSTRACT: Cytochrome P450 aromatase is an enzyme that is responsible for a key step in the biosynthesis of estrogens that is linked to reproduction. This enzyme is a product of the *CYP450* gene and catalyzes the formation of estrogen from androgen. Estrogen is essential for the development of the gonads and various other physiological processes, ranging from normal growth to reproductive behavior. This study aimed at validation of primers for microsatellite locus present in regulatory region of *CYP19b* gene in *Oreochromis niloticus*. Thirty samples of three strains: Chitralada and the Supreme from larviculture Aquabel and GIFT from State University of Maringá - PR were analyzed. After extraction of DNA samples were subjected to PCR using primers designed to flank a microsatellite region. After confirmation of amplification samples were subjected to electrophoretic separation in apparatus Origins (Elchrom Scientific, USA) to identify the alleles. It was identified that there is a polymorphism in the promoter region of the *CYP19b* in the three strains. We observed three alleles, ranging between 123 and 141 bp. The primers for amplification of microsatellite in the regulatory region of the *CYP19b* gene were efficient and therefore its use for identification of mutations in this region may be employed in typical microsatellite analysis. Evaluation studies of this polymorphism with the efficiency of reversal by temperature are being conducted.

KEYWORDS: fish, polymorphism, sex reversal

INTRODUÇÃO

A reversão sexual em Tilápias com o uso hormonal é utilizada para eliminar ou minimizar a reprodução nos tanques e alcançar uma maior produção de peixes através do melhor crescimento dos

machos; além de maior uniformização dos lotes. A técnica consiste na reversão de fêmeas para machos pelo uso de hormônios esteróides masculinizantes (Tachibana et al., 2004).

O uso de hormônios na produção animal vem sendo questionado em qualquer fase de criação, dosagem ou tempo de utilização dos animais destinados ao consumo humano (BIBLIO) e embora a reversão sexual com o uso de hormônios esteróides seja o método direto mais difundido e utilizado, existe hoje uma tendência na utilização de técnicas indiretas e diretas que não utilizam estes compostos. A busca destas alternativas ocorre principalmente, devido à preocupação dos consumidores com os efeitos residuais dos hormônios esteróides no meio ambiente e com a saúde humana (Oliveira et al., 2008).

Uma variedade de vias bioquímicas envolvendo muitas proteínas diferentes (por exemplo, fatores de transcrição, enzimas esteroidogênicas, receptores e sistemas de segundo mensageiro, etc.) podem atuar no controle da diferenciação do sexo. Uma vez que a temperatura pode influenciar drasticamente a estrutura e função de proteínas e outras macromoléculas; flutuações de temperatura podem alterar as vias de determinação do sexo e, conseqüentemente, alterar o desenvolvimento da diferenciação do sexo de machos e fêmeas. Baseando-se nisso, alguns pesquisadores utilizam a temperatura como método alternativo de reversão sexual ao tratamento hormonal (Baras et al., 2000, 2001; Wang e Tsai, 2000; Tsai et al., 2003; Azaza et al., 2008). A resposta à esta reversão apresenta um fundo genético (Baras et al., 2001; Tessema et al., 2006; Stelkens, 2010). Este controle genético passível de seleção para resposta ao tratamento com temperatura para reversão sexual foi observado por alguns pesquisadores (Wessels & Hörstgen-Schwark, 2007) que obtiveram herdabilidades altas, da ordem de 0,69 para a linha com alta resposta à seleção para temperatura e 0,86 para a linha com baixa resposta à seleção para temperatura de reversão. Portanto, frente a estes valores de herdabilidade a resposta a seleção será elevada e obtida em um curto espaço de tempo.

Os resultados de Price (1984) demonstraram que muitos marcadores sexuais possuem papéis essenciais na produção dos peixes. Alguns marcadores ligados ao sexo têm sido identificados através de estudos de ligação genética em Tilápias. Contudo, uma dissecação de maior resolução é necessária

para saber se estes marcadores estão presentes em genes atuando diretamente na determinação e/ou diferenciação do sexo, ou próximo de genes que realizam esta função.

Baseado nessas observações e na necessidade de atender a demanda do mercado, bem como melhorar os níveis de produção é importante identificar o(s) gene(s) envolvidos neste controle da resposta da reversão baseada na temperatura. Genes ligados à conversão de estrógenos a partir de andrógenos são candidatos a fazerem parte deste mecanismo de controle da reversão sexual e, portanto, passível de sofrerem efeitos da temperatura. Este indicativo baseia-se no fato que vários trabalhos confirmaram que o estrogênio é requerido para diferenciação dos ovários (Kwon et al., 2000; Kobayashi et al., 2003), e portanto, genes regulando a sua síntese estariam ligados a determinação e/ou diferenciação do sexo.

O complexo enzimático da aromatase é responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos em vertebrados (Wang et al., 2010). Uma das principais enzimas desse complexo é a citocromo P450arom. Portanto, a regulação da expressão gênica desta enzima está diretamente ligada à diferenciação sexual. Entretanto não há nenhum relato do estudo da variação genética nas regiões promotora das duas variantes gênicas da aromatase e de sua relação com características reprodutivas nas linhagens de Tilápia em uso na aquicultura brasileira.

Baseado no exposto o objetivo deste estudo é verificar se há polimorfismo para um locus de microssatélite presente na região regulatória do gene *CYP19arom* em linhagens comerciais de tilápia do Nilo utilizadas na piscicultura brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 30 amostras de três linhagens: Chitralada e Supreme provenientes da Piscicultura Aquabel de Rolândia – Paraná e a Genetically Improved Farmed Tilápia (GIFT) obtida da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para a extração de DNA genômico foi utilizada a metodologia baseada no uso de Fenol Clorofórmio. A integridade do DNA foi checada em gel de agarose 1%, corado com GelGreen (Biotium, USA) e visualizado no aparelho Dark Reader sob luz branca (Clare Chemical, USA).

De acordo com a sequência depositada no Genbank (“accession numbers”: AF472621) (WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV ano 2009) (Chang et al., 2005), foram desenhados *primers* com o programa Vector NTI 8.0 (Invitrogen, USA) para um locus de microsatélite presente na região regulatória do gene da *CYP19b* de Tilápia. A sequência dos *primers* obtidos foram: *forward* 5'-ACCATAGATTGGGTGTGGGGA -3' e na outra extremidade o primer *reverse* 5'-ACAAGGAATACCCTGCCTGTGGT -3'.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 50 ng de DNA genômico, 2 pmoles de cada primer, 1X buffer de PCR [10mM Tris Hcl (pH 9.0), 1,5 mM MgCl e 50 mM KCl], 200mM de cada dNTP e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas, USA). A reação sem a presença de DNA (negativo) foi utilizada em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação dos reagentes. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Alemanha). Foi utilizada a seguinte programação para amplificação: um passo inicial de 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 8 minutos. As amplificações foram cheçadas em gel de agarose a 1% corado com GelGreen (Biotium, USA). Após a confirmação da amplificação as amostras foram submetidas à separação eletroforética no aparelho Origins (Elchrom Scientific, USA) utilizando uma matriz Spreadex® EL 600 Wide Mini S-2x25 para identificação de alelos seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Os géis foram analisados sob luz ultravioleta e fotografados digitalmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura-1 é apresentado o resultado da amplificação utilizando os *primers* desenhados para a região promotora, flanqueante ao microsatélite de interesse. As amostras amplificadas não

apresentaram o tamanho esperado de 201pb, isto pode ter ocorrido por dois motivos: a sequência depositada no Genbank (accession numbers: AF472621) (WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV) (Chang et al., 2005) ser diferente em relação a sequência gênica das linhagens que foram utilizadas neste trabalho ou os *primers* terem anelado em outra região do genoma. Embora ambas as hipóteses não possam ser descartadas, o fato das temperaturas de anelamento serem elevadas sugere que o produto seja específico, ou seja, que estes *primers* são de fato específicos para a região de interesse. Além disso, algumas amostras foram sequenciadas e demonstraram a presença de um microssatélite (dados não publicados). Embora não tenha sido realizado um alinhamento das sequências; sugere-se que os *primers* estão anelando no gene alvo.

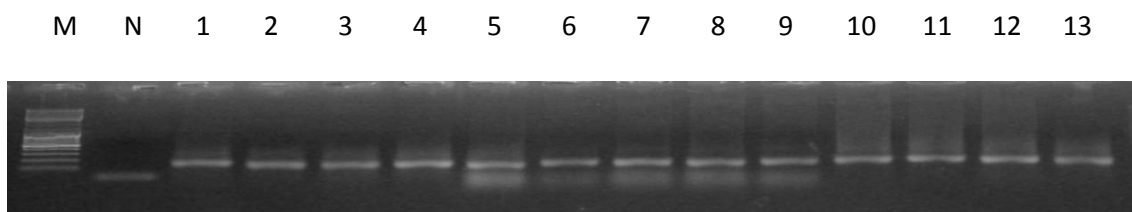


Figura 1 - Checagem da amplificação para o locus microssatélites no gene *CYP19b* para amostras de Tilápia de diferentes linhagens. Canaletas de 1 a 13 amostras de DNA de Tilápia. N negativo e M marcador Generuler Ladder Mix (Fermentas). Gel de agarose 1% corado com Gelgreen e visualizado em luz UV.

Alguns estudos constataram uma expressão diferencial do gene da aromatase quando os peixes foram submetidos a diferentes temperaturas durante o período de reversão (Baroiller & D'Cotta, 2001; Tsai et al., 2003). Apesar dessa informação, ainda não se tem compreensão do mecanismo que regula esta expressão diferencial da aromatase por influência da temperatura. Na maioria dos genes os elementos presentes na região regulatória controlam os níveis de expressão. Alguns trabalhos têm apontado que microssatélites presentes na região regulatória influenciam os níveis de expressão (Kocher & Streelman, 2002).

Na figura-2 é apresentado o resultado da eletroforese utilizando a matriz Spreadex® EL 600 Wide Mini S-2x25 (Elchrom Scientific). Como pode se observar, foram identificados três alelos, variando em 123 e 141 pb. Portanto, existe um polimorfismo do tipo microssatélite nesta região regulatória do gene *CYP19b*. O alelo A foi o mais frequente nestas linhagens e o alelo C foi

encontrado somente na linhagem Supreme. Contudo, uma análise com um número maior de amostras deverá ser realizada para verificar se o alelo C é exclusivo da linhagem Supreme.

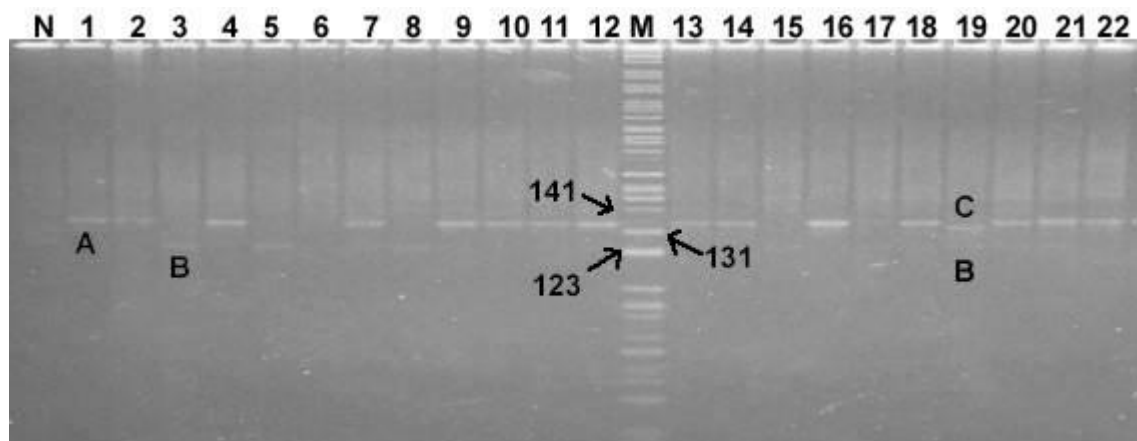


Figura 2 - Amplificações de microsatélites presente na região promotora do gene *CYP19b* para amostras de Tilápia em gel Spreadex® EL 600 Wide Mini S-2x25. 01 ao 07 = Linhagem Chitralada; 08 ao 14 = Linhagem GIFT; 15 ao 22 = Linhagem Supreme; N = controle negativo; M = marcador M3 marker; A, B e C = três diferentes alelos.

Amostras contendo os diferentes alelos foram reamplificadas nas condições descritas anteriormente e purificadas para realização do sequenciamento. Embora tenha ocorrido uma grande diferença de tamanho entre o fragmento esperado baseado na sequência depositada por Chang et al (2005), estes *primers* anelaram em um loci de microsatélite, baseados nos resultados do sequenciamento até o momento.

A utilização deste marcador em um experimento de reversão permitirá avaliar se este polimorfismo presente nesta região do gene *CYP19b* possui alguma relação com a variabilidade observada na resposta à reversão através da temperatura durante a fase de diferenciação sexual em Tilápias.

CONCLUSÕES

Os *primers* desenhados para amplificação do microsatélite na região regulatória do gene *CYP19b* foram eficientes. Portanto seu uso para identificação de mutações nesta região pode ser empregado na análise típica de microsatélite. Uma análise de qRT-PCR deverá ser realizada para observar o efeito deste polimorfismo sobre a expressão do gene e ver se essa interfere na reversão sexual baseada na temperatura.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de auxílio e financiamentos.

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas, nº de registro no CEEA: **1152**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZAZA, M.S.; DHRAÏEF, M.N.; KRAÏEM, M.M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *Journal of Thermal Biology*, v. 33, p 98–105, 2008.

BARAS, E.; PRIGNON, C.; GOHOUNGO, G.; MÉLARD, C. Phenotypic sex differentiation of blue tilapia under constant and fluctuating thermal regimes and its adaptative and evolutionary implications. *Journal of Fish Biology*, v. 56, p 88–96, 2000.

BARAS, E.; JACOBS, B.; MÉLARD, C. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX – XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v. 92, p 187–199, 2001.

BAROILLER, J.F.; D'COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C Pharmacology and Toxicology**, v. 130, p.399–409, 2001.

CHANG, X.; KOBAYASHI, T.; SENTHILKUMARAN, B.; KOBAYASHI, T.; SENTHILKUMARAN, B.; KOBAYASHI-KAJURA, H.; SUDHAKUMARI, C. C.; NAGAHAMA, Y. Two types of aromatase with diverent encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 141, p. 101–115, 2005

KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. **Cytogenetic Genome Research**. v. 101, p.289–294, 2003.

KOCHER, T.D.; STREELMAN, J.T. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of saltchallenged tilapia. **Physiological Genomics**. v. 9, p.1–4, 2002.

KWON, J.Y.; HAGHPANAH, V.; KOGSON-HURTADO, L.M et al. Masculinization of genetic female nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. **Journal of Experimental Zoology**. v. 287, p.46–53, 2000.

OLIVEIRA, P. A. HEIN, G.; ALMEIDA, D. B.; COSTA, M. A. P.; MOREIRA, C. G.A. ; SILVA, J. C.; TAVARES, R. A.; TEIXEIRA, F.; MANZKE, V. H. B.; MOREIRA, H. L. M. . Avaliação da

reversão sexual de alevinos de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) com o uso de vorozol em estufa. In: XVI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Pelotas. Pesquisa e Responsabilidade Ambiental. Pelotas : Editora e Gráfica Universitária, 2007.

PRICE, D.J. Genetics of sex determination in fishes: a brief review. **In: Potts, G.G., Wootton, R.J. (Eds.), Fish Reproduction: Strategies and Tactics.** Academic Press, London, p.77–89, 1984.

STELKENS, R. B.; WEDEKIND, C. Environmental sex reversal, Trojan sex genes, and sex ratio adjustment: conditions and population consequences. **Molecular Ecology.** v.9, p. 627–646, 2010.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. Desempenho de diferentes linhagens de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. *Acta Scientiarum, Maringá*, v. 26, p. 305–311, 2004.

TESSEMA, M.; MÜLLER-BELECKE, A.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Effect of rearing temperatures on the sex-ratios of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture*, v. 258, p. 270–277, 2006.

TSAI, C.L.; CHANG, S.L.; WANG, L.H.; CHAO, T.Y. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain. *Journal Neuroendocrinology*, v. 15, p. 97–102, 2003.

WANG, D. S.; ZHOU, L. Y.; KOBAYASHI, T.; MATSUDA, M.; SHIBATA, Y.; SAKAI, F.; NAGAHAMA, Y. Doublesex-and *Mab-3*- Related Transcription Factor-1 Repression of Aromatase Transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. **Endocrinology**, v. 151, p. 1331–1340, 2010.

WANG, L.H.; TSAI, C.L. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology*. v. 286, p 534–537, 2000.

WESSELS, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. **Aquaculture**, v. 272, S1, p.S80–S87, 2007.

5. Artigo Submetido à revista Aquaculture Research

Análise do gene *CYP19a* em *Oreochromis niloticus* e suas correlações com caracteres reprodutivos em alevinos da linhagem Supreme mantidos em sistema de recirculação de água.

Resumo

A aromatase citocromo P450, é uma enzima que é responsável por uma etapa chave na biossíntese de estrogênio que está ligado à reprodução. Esta enzima é um produto do gene CYP450 e cataliza a formação de estrogênio para androgênio. O estrogênio é essencial para o desenvolvimento das gônadas e outros diversos processos fisiológicos, que vão desde o crescimento normal até o comportamento reprodutivo. Este estudo teve como objetivo correlacionar o polimorfismo no gene *CYP19a* da linhagem de Tilápia Supreme com as proporções de sexo encontrado em dois tratamentos com temperaturas diferentes e estabelecer possíveis relações entre eles. Foram analisadas 122 animais do tratamento a 25°C e 129 animais do tratamento a 35°C. Após a extração de DNA as amostras foram submetidas a PCR utilizando os *primers* desenhados para flanquear uma região de interesse. Após confirmação da amplificação as amostras foram submetidas à separação eletroforética no aparato *Origins* para identificação dos alelos. Foi identificado que há um polimorfismo na região regulatória do gene CYP19a, foram observados 5 alelos. A proporção de fêmeas e machos encontrada no tratamento a 25°C foi de 1:2,3 e de 1:2,88 no tratamento a 35°C. Contudo, pode-se supor que o polimorfismo presente nesta porção da região regulatória pode estar relacionado à reversão sexual encontrada.

Palavras-chave: aromatase ovariana, tilápia, polimorfismo, reversão sexual.

Analysis of gene CYP19a in *Oreochromis niloticus* and its correlation with reproductive characters in the Supreme strain fingerlings kept in recirculating water system.

Abstract

Aromatase cytochrome P450 is an enzyme that is responsible for a key step in the biosynthesis of estrogen that is linked to reproduction. This enzyme is a product of the CYP450 gene and catalyzes the formation of estrogen to androgen. Estrogen is essential for the development of the gonads and other diverse physiological processes, ranging from normal growth to reproductive behavior. This study aimed to correlate gene polymorphism CYP19a line of Supreme Tilapia with sex ratios found in both treatments at different temperatures and to establish possible relationships between them. We analyzed 122 animals of treatment at 25 ° C and 129 animals of treatment at 35 ° C. After extraction of DNA samples were subjected to PCR using primers designed to flank a region of interest. After confirmation of amplification samples were subjected to electrophoresis on Origins apparatus for identification of alleles. It was identified that there is a polymorphism in the regulatory region of the gene CYP19a, 5 alleles were observed. The proportion of females and males found in the treatment at 25 ° C was 1:2,3 1:2,88 and treatment at 35 ° C. However, it can be assumed that the polymorphism present in this portion of the regulatory region may be related to sex reversal found.

Keywords: aromatase ovarian, tilapia, polymorphism, sex reversal.

1. Introdução

O grande crescimento da aquicultura mundial nos últimos 50 anos se baseia principalmente no domínio de métodos de reprodução controlada de algumas das principais espécies, na facilidade de transporte a longas distâncias e no desenvolvimento e disponibilidade de alimentos artificiais (BORGES et al., 2005).

A Tilápia é considerada um dos peixes mais importantes na atualidade para Aquicultura; é encontrada em mais de cem países com uma produção em 2006 de 800 mil toneladas e com uma estimativa de 3 milhões de toneladas em 2009 (FAO, 2007).

As Tilápias em sua maioria alcançam a maturidade sexual muito cedo, geralmente entre o quarto e sexto mês de vida, desviando nessa etapa, sua energia para a reprodução e cuidado parental (KUBITZA, 2000). Como consequência da sua alta prolificidade ocorre superpopulação nos ambientes de cultivo, direcionando a competitividade, ocasionando uma

redução da taxa de crescimento, depreciação da qualidade da água e conseqüentemente à mortalidade (KUBITZA, 2000).

Frente a esta problemática, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de encontrar métodos eficazes de reversão sexual em muitas espécies de peixes usadas para a produção (SCHÖTTERER, 2004; BEZAULT, 2007). O uso de hormônios continua sendo uma das técnicas mais utilizadas (BEARDMORE et al., 2001), embora seja bastante questionada quanto aos resíduos que são lançados no meio ambiente e que podem ser transmitidos ao consumidor (OLIVEIRA et al., 2008).

O melhoramento genético é uma das ferramentas mais aceitas e utilizadas para obter características desejadas em Tilápia e outros peixes, onde uma forma de acelerar o processo de melhoramento genético é a utilização de marcadores moleculares na seleção assistida por genes (marcadores diretos) (SCHÖTTERER, 2004).

Pesquisadores têm demonstrado que muitos marcadores moleculares para diferenciação e/ou reversão sexual podem contribuir de maneira significativa na produção de peixes (PRICE, 1984; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002). Com isso, o principal objetivo da análise com marcadores, para fins de melhoramento genético, é tentar estabelecer se há uma associação entre o polimorfismo observado no marcador molecular e o valor fenotípico da característica de interesse (SCHÖTTERER, 2004). E a seleção assistida usando marcadores moleculares permite verificar, até mesmo em estágios iniciais da vida embrionária de animais, se os genes de interesse econômico foram eliminados ou adicionados. Na maioria das espécies os marcadores sexuais geralmente não têm uma ligação detectada. Por isso, a maioria dos sistemas de determinação do sexo (SDS) conhecidos em peixes está sendo obtido através de manipulação de cromossomos ou reversão sexual com hormônios associados com teste de progênie (BEZAULT, 2007).

O estrogênio desempenha um papel fundamental na diferenciação sexual das gônadas nos vertebrados sem útero (SMITH e SINCLAIR, 2004; LIU et al., 2007; COVENEY et al., 2001). A aromatase *P450* é a enzima esteroidogênica responsável pela transformação de andrógenos em estrógenos. A hipótese de que o estrogênio e a *Cyp19a1a* estão envolvidos na diferenciação do ovário em peixes tem sido bem aceita. Guiguen et al., (2009) afirma a hipótese de que uma alta regulação da expressão de *Cyp19a1a* é necessário para desencadear e manter a diferenciação do ovário e que a regulação da expressão de *Cyp19a1a* é o único

passo necessário para induzir a diferenciação testicular, ou porque a supressão da expressão gênica de *Cyp19a1a* inibi a atividade enzimática da *Cyp19a1a*, ou o bloqueio de receptividade do estrogênio é invariavelmente associado à masculinização.

Recentemente, tem sido destaque que o aumento da temperatura, invariavelmente, resulta em um aumento no número de machos de espécies de peixes termosensíveis (OSPINA-ÁLVAREZ e PIFERRER, 2008). A alta repetibilidade da resposta à reversão do sexo, com tratamentos de temperatura, só foi comprovada em Tilápias (*Oreochromis niloticus*) por Tessema et al., 2006.

Assim, a falta de estrogênio causada pela expressão gênica suprimida da aromatase, torna-se responsável pela masculinização de “fêmeas genéticas” quando os peixes são expostos a alta temperatura. (SOCORRO et al., 2007). Contudo, o modo de ação da temperatura sobre a diferenciação sexual durante a embriogênese, é um processo que ainda não é compreendido.

Este estudo tem como objetivo correlacionar o polimorfismo no gene *CYP19a* da linhagem de Tilápia Supreme com as proporções de sexo encontrado em dois tratamentos com temperaturas diferentes e estabelecer possíveis relações entre eles.

2. Material e Métodos

2.1 Local e execução

O experimento foi realizado nas instalações da Universidade Federal de Pelotas no período de 15/04/2010 a 24/08/2010 com a aprovação do Comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas, nº de registro no CEEA: 1152.

Os animais foram obtidos da Piscicultura Aquabel em Rolândia – PR. Foram utilizadas ~ 1.500 larvas com três dias de eclosão, na fase final de reabsorção do saco vitelínico. As larvas foram mantidas em um sistema de recirculação fechado em caixas de 40L, providas de aquecimento e aeração constantes (Figura 1).



Figura 1 – Sistema de recirculação de água do Laboratório de Engenharia Genética Animal da Universidade Federal de Pelotas.

2.2 Experimento de reversão por temperatura

Os animais foram subdivididos em lotes de ~ 93 larvas por unidade experimental. O período de exposição aos tratamentos com temperatura controlada foi de 30 dias, com fotoperíodo de 12:12 horas claro:escuro, tendo oito repetições em cada temperatura: 25°C (T25) e 35°C (T35). Os animais foram alimentados a cada uma hora utilizando ração comercial contendo 50% de proteína bruta. Após os 30 dias a água foi resfriada gradativamente, até atingir 27°. A qualidade da água foi mantida por meio de filtros biológicos e de sifonagem diária, sendo feita a renovação diária de água, entre 20 e 25% do volume total. Os parâmetros físico-químicos da água foram observados semanalmente. A mortalidade foi verificada diariamente através de observação direta das unidades experimentais. O peso dos peixes foi determinado através de uma balança de precisão de 0,0001g (Bel Engineering Mark 500, Classe II) e o comprimento total (TL) e comprimento padrão (SL) através de um paquímetro de 0,05mm de precisão (MARBERG 150X0.05mm, 6"x1/128 in Vernier). Ao final do experimento os animais foram sacrificados através de eutanásia, sendo pesados, medidos e identificados individualmente.

2.3 Identificação dos sexos

Para sexagem dos animais, suas gônadas foram encaminhadas para análise histopatológica, e posteriormente foram fixadas em formol tamponado a 10%, entre o período de 48 a 72 horas. Depois disso, foram incluídas em parafina, cortados a 5-3 μ m de espessura e corados por hematoxilina-eosina para posterior observação em microscópio óptico. Em ambos os grupos T25 e T35 os animais foram sacrificados através da administração de anestésico benzocaína e posteriormente foi realizada a necropsia dos indivíduos (Figura 2).

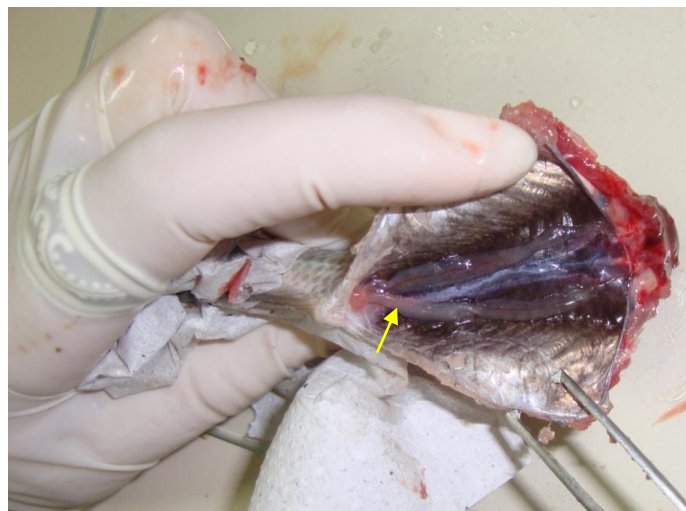


Figura 2 – Indicação das gônadas de Tilápia objeto de estudo.



Figura 3 – Foto de gônadas retiradas de um peixe do tratamento a 35°C.

2.4 PCR-SSCP para o gene *CYP19a*

Para identificar se há variação genética no gene *CYP19a*, e caracterizar os genótipos derivados da combinação dos diferentes alelos serão obtidas amostras aleatórias de 100 peixes para análise do polimorfismo. De acordo com as sequências depositadas no *Genebank*: banco de dados genéticos de seqüências no Centro Nacional de Biotecnologia da Informação (*NCBI*) (*GenBank* ID: AF472620) (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Chang et al., 2005).

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de músculo, utilizando a metodologia descrita por Almeida et al., 2008. A integridade do DNA foi checada em gel de agarose 1%, corado com *GelGreen* (Biotium) e visualizado no aparato *Dark Reader* sob luz branca (*Clare Chemical*). *Primers* foram desenhados com o programa *Vector NTI 8.0* (Invitrogen, USA) para amplificar fragmentos na região promotora do gene *CYP19a* de Tilápias. A sequência dos *primers* obtidos foi: *forward* 5'- CAGACGAGGTTACGCACACT -3' e na outra extremidade o primer *reverse* 5'- CCCATGCTGTCTGCTCTTGA -3.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada em volume final de 25µl, contendo 50 ng de DNA genômico, 2 pmoles de cada *primer*, 1X buffer de PCR [10mM Tris Hcl (pH 9.0), 1,5 mM MgCl e 50 mM KCl], 200mM de cada dNTP e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas, USA). A reação sem a presença de DNA (negativo) foi utilizada em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação dos reagentes. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Alemanha). Foi utilizada a seguinte programação para amplificação: um passo inicial de 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 3 minutos, anelamento a 57°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 8 minutos. As amplificações foram cheçadas em gel de agarose a 1% corado com *GelGreen* (Biotium, USA). Após a confirmação da amplificação as amostras foram submetidas à separação eletroforética no aparelho *Origins* (Elchrom Scientific, USA) utilizando uma matriz *Spreadex® EL 600 Wide Mini S-2x25* para identificação de alelos seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Os géis foram analisados sob luz ultravioleta e fotografados digitalmente.

2.5 Análise estatística

Para ambos os tratamentos (T25 e T35) foi calculada a proporção de machos, fêmeas e animais indeterminados através de uma regra de três tendo como o total de amostragem o total de animais analisados por tratamento.

Verificou-se a normalidade e homocedasticidade de todas as variáveis envolvidas neste estudo a través de testes de Lilliefors e Levene respectivamente. A significancia estatística foi considerada sempre que $p < 0,01$. O programa estatístico utilizado foi o STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa).

2.5.1 Correlação entre as medidas morfométricas e peso para o mesmo sexo e entre sexos, animais indefinidos e animais não processados.

Para ambos os tratamentos (T25 e T35) e por separado, primeiramente foi verificada a correlação existente entre as três medidas tomadas (peso, TL e LS) entre animais do mesmo sexo. Logo foi verificada a correlação existente para as três medidas tomadas entre sexos diferentes, animais indefinidos e animais não processados dentro de um mesmo tratamento.

A correlação entre tratamentos não foi realizada porque os animais utilizados no T25 eram menores, por isso tinham 41 dias de diferença de abate do que os utilizados para o T35.

2.5.2 Relação das medidas morfométricas com o sexo

Esta análise não foi realizada com o peso para evitar a influência de uma variação diária (e.g. Croxall 1995): calculou-se o índice corporal de Quételet através da seguinte fórmula: $BMI = \text{peso}/TL^2$. Em ambos os tratamentos, para constatar uma possível relação entre os sexos e os animais de sexo indefinido com as medidas morfométricas tomadas e o BMI foi realizada uma análise de variância (ONE WAY ANOVA). Foram tomadas como variáveis dependentes o TL, o SL e o BMI; e como variável categórica o sexo (macho, fêmea e indefinido).

Para esta análise fundimos os animais não processados ao grupo dos animais sem sexo definidos (indefinidos) e passamos a chamar o grupo de “indeterminados” (unsexed).

3 Resultados

Os parâmetros físico-químicos de qualidade de água monitorados encontram-se dentro do recomendado para a aquíicultura por Tavares (1995).

A taxa de mortalidade apresentada pelos tratamentos T25 e T35 é de 15,4% e 7,6%, respectivamente (Tabela 1). A taxa de mortalidade diminuiu drasticamente na temperatura mais alta, a partir do 16º dia de tratamento com temperatura (ver figura 4).

Tabela 1 – Taxa de mortalidade de Tilápia do Nilo da Linhagem Supreme, em ambos tratamentos (25°C e 35°C), durante o tratamento de 34 dias.

Período de exposição (dias)	Indivíduos mortos (n)		Taxa de mortalidade (%)	
	25° C	35° C	25° C	35° C
3	12	8	1,2	0,8
6	1	3	0,1	0,3
8	20	23	2	2,3
9	8	3	0,8	0,3
10	15	13	1,5	1,3
11	18	13	1,8	1,3
12	6	10	0,6	1
13	7	0	0,7	0
14	0	2	0	0,2
16	1	0	0,1	0
19	10	0	1	0
20	11	0	1,1	0
21	13	0	1,3	0
23	2	0	0,2	0
25	19	1	1,9	0,1
26	5	0	0,5	0
27	2	0	0,2	0
32	2	0	0,2	0
34	2	0	0,2	0
Total	154	76	15,4	7,6

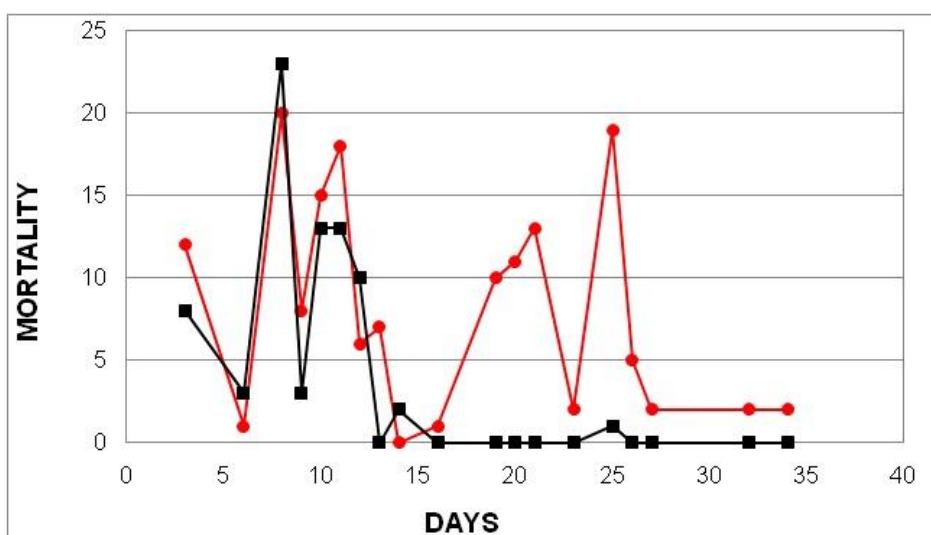


Figura 4 - Gráfico da taxa de mortalidade de Tilápia da Linhagem Supreme nos tratamentos a 25°C (vermelho) e 35°C (preto) com 34 dias de tratamento.

3.1.1 Experimento de reversão sexual com o grupo T25:

Apesar dos peixes coletados estarem com idade de 115 dias e um tamanho médio de 9,31cm, algumas gônadas eram extremamente pequenas, tornando inviável o seu processamento. Em função disto, das 122 amostras de gônadas deste tratamento foram utilizadas 87, portanto 35 não foram processadas. Na figura 5 é apresentado uma gônada feminina para este tratamento.

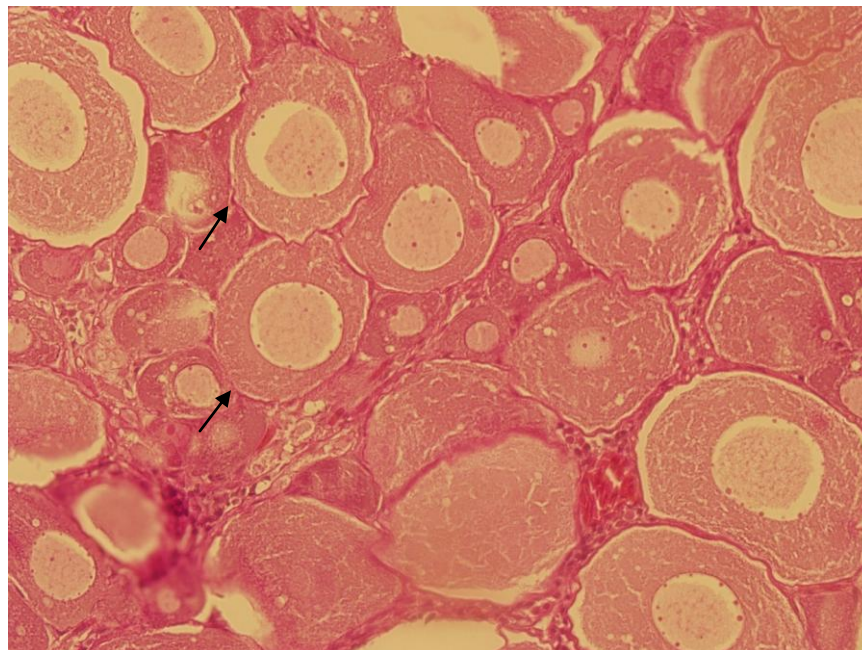


Figura 5 – Gônada de fêmea tratamento a 25°C. 20x/0,5- Indicação da formação de ovócitos. Fixação em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina, cortados a 5-3µm de espessura e corados por hematoxilina-eosina.

Conforme apresentado na tabela 2, das 122 amostras analisadas foram identificados 18,8 % de fêmeas e 44,3% de machos. Do restante, 8,2% eram indefinidos e 28,7% correspondiam as amostras não processadas. A proporção entre fêmeas e machos foi da ordem de 1:2,3.

Tabela 2 - Percentagens de sexos de *Oreochromis niloticus* da linhagem Supreme, após tratamento com temperaturas de 25°C e 35°C, a partir do 3º dia após a eclosão.

Tratamento (T°)	Macho (n)	Fêmea (n)	Indetermin. (n)	Não proces. (n)	Total (n)	Macho (%)	Fêmea (%)	Indetermin. (%)	Não proces. (%)
25	54	23	10	35	122	44,26	18,85	8,2	28,7
35	78	27	10	14	129	60,46	20,93	7,75	10,85

3.1.2 Correlação entre as medidas morfométricas e peso para o mesmo sexo e entre sexos, animais indefinidos e animais não processados.

Constatou-se que não há correlação entre os sexos e indivíduos sexualmente indeterminados para as mesmas medidas (peso, TL e SL). Dentro do mesmo sexo e entre os animais com sexo indefinido todas as medidas estão correlacionadas.

3.1.3 Relação das medidas morfométricas e BMI (índice corporal de Quételet) com o sexo

Há uma diferença significativa para a relação das variáveis morfométricas com os sexos e animais indeterminados como um todo ($df= 2, 153$; $F=3,1$ $p<0,01$), porém, o BMI de forma individual não apresenta relação com os sexos ($p> 0,01$). A representação gráfica para as variáveis morfométricas significativamente diferentes entre sexos e animais indeterminados pode ser vista na Figura 6 e Figura 7 para CT e SL respectivamente.

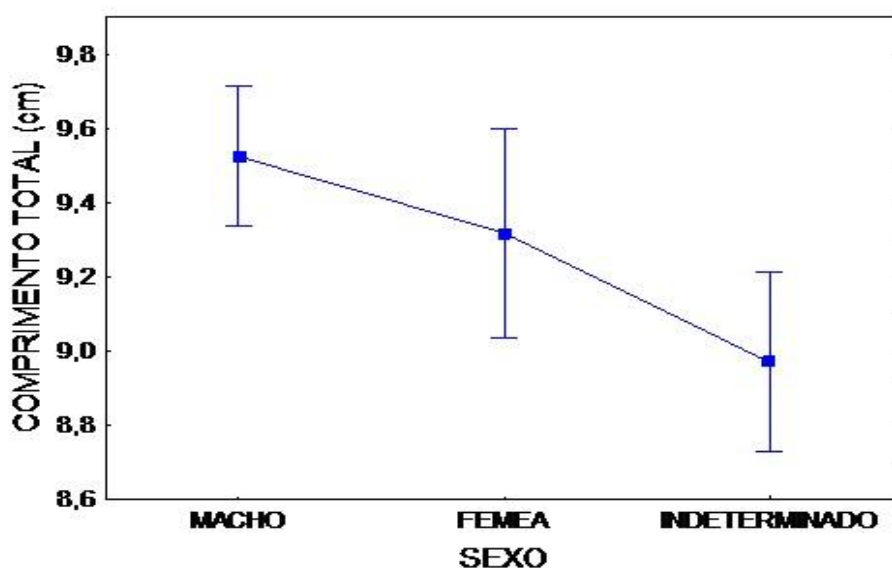


Figura 6 - Intervalos de comprimento total, dependendo do sexo da Tilápia, a 25 ° C (masculino, feminino e indeterminado).

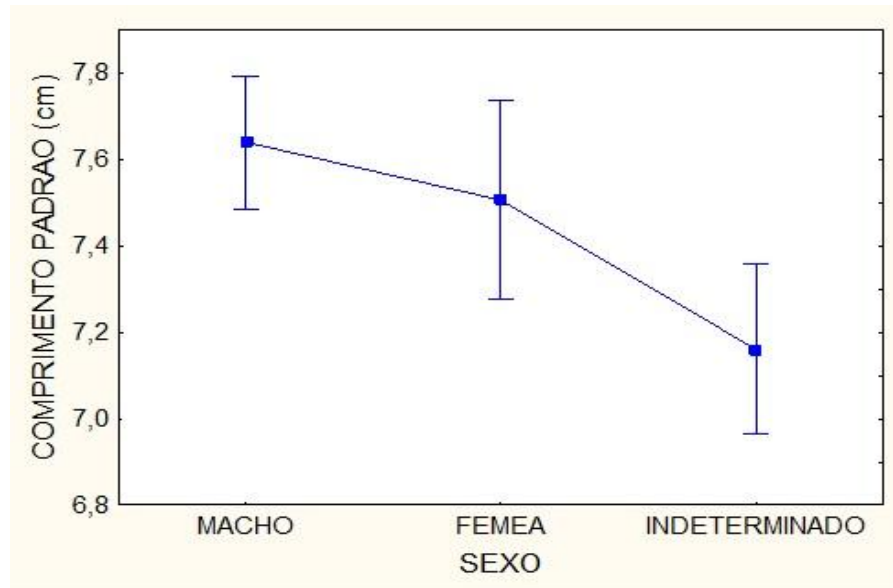


Figura 7- Intervalos de comprimento padrão, dependendo do sexo da Tilápia, a 25 ° C (masculino, feminino e indeterminado).

3.2 Experimento de reversão sexual com o grupo T35:

Apesar dos peixes coletados estarem com idade de 74 dias e um tamanho médio de 9cm, algumas gônadas eram extremamente pequenas, tornando inviável o seu processamento. Em função disto, das 129 amostras de gônadas deste tratamento foram utilizadas 115, portanto 10 não foram processadas. Na figura 8 e na figura 9 é apresentado uma gônada masculina e uma gônada indeterminada para este tratamento.

Conforme apresentado na tabela 2, das 129 amostras analisadas foram identificados 20,9% de fêmeas e 60,5% de machos. Do restante, 7,75% eram indefinidos e 10,85% correspondiam as amostras não processadas. A proporção entre fêmeas e machos foi da ordem de 1:2,88.

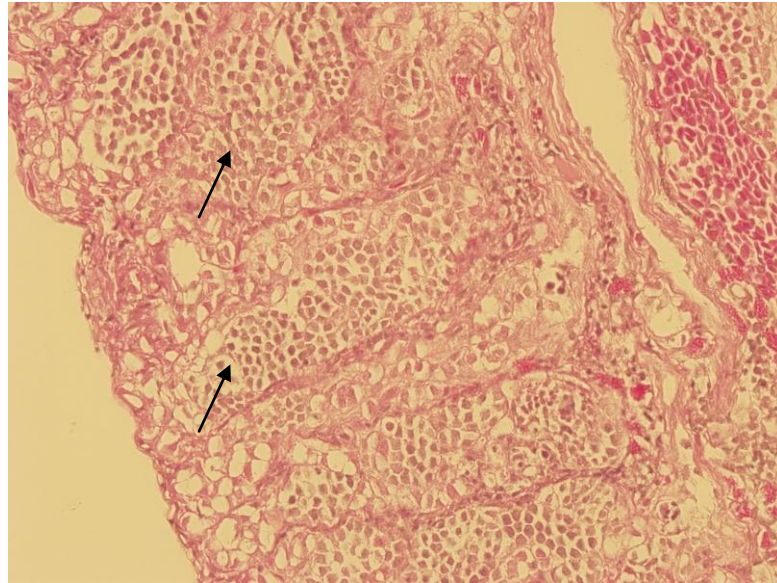


Figura 8 - Gônada de macho tratamento a 35°C. 20x/0,5 indicando espermatócitos. Fixação em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina, cortados a 5-3 μ m de espessura e corados por hematoxilina-eosina.

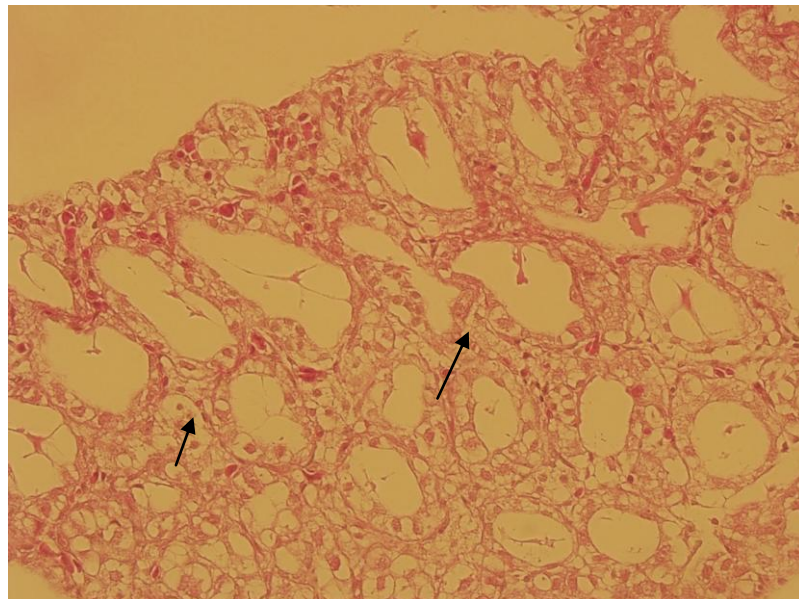


Figura 9 – Gônada de indivíduo indefinido (T35). 20x/0,5 indicando a não formação de ovócito e nem formação de espermatócito, células sem definição. Fixação em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina, cortados a 5-3 μ m de espessura e corados por hematoxilina-eosina.

3.2.1 Correlação entre as medidas morfométricas e peso para o mesmo sexo e entre sexos, animais indefinidos e animais não processados.

Constatou-se que não há correlação entre os sexos e indivíduos sexualmente indeterminados para as mesmas medidas (peso, CT e SL). Semelhante ao que ocorreu no tratamento T25, todas as medidas estão correlacionadas dentro do mesmo sexo e entre os animais com sexo indefinido.

3.2.2 Relação das medidas morfométricas e BMI com o sexo

Para o tratamento a 35°C não houve diferença significativa entre as três medidas para ambos os sexos e para os indivíduos indeterminados dentro do tratamento ($df=2, 126$; $F= 2$; $p>0,05$).

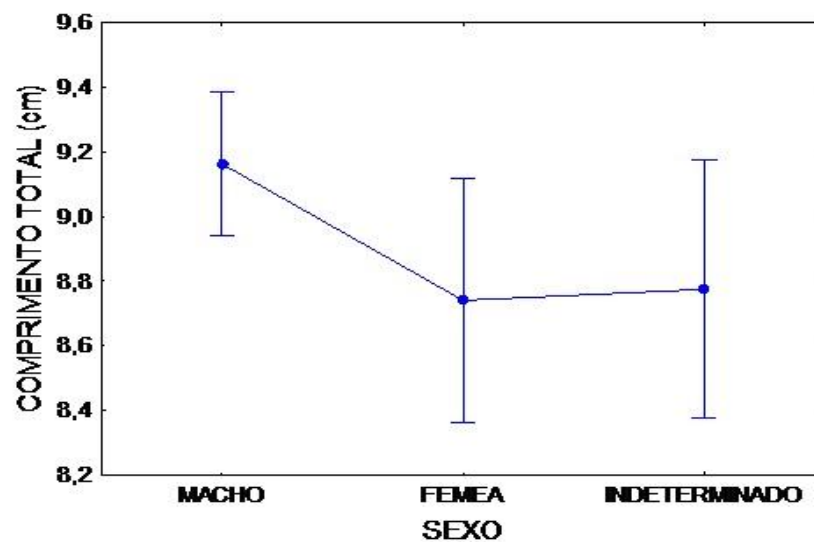


Figura 10 - Intervalos de comprimento total dependendo do sexo da Tilápia a 35 ° C (masculino, feminino e indeterminado).

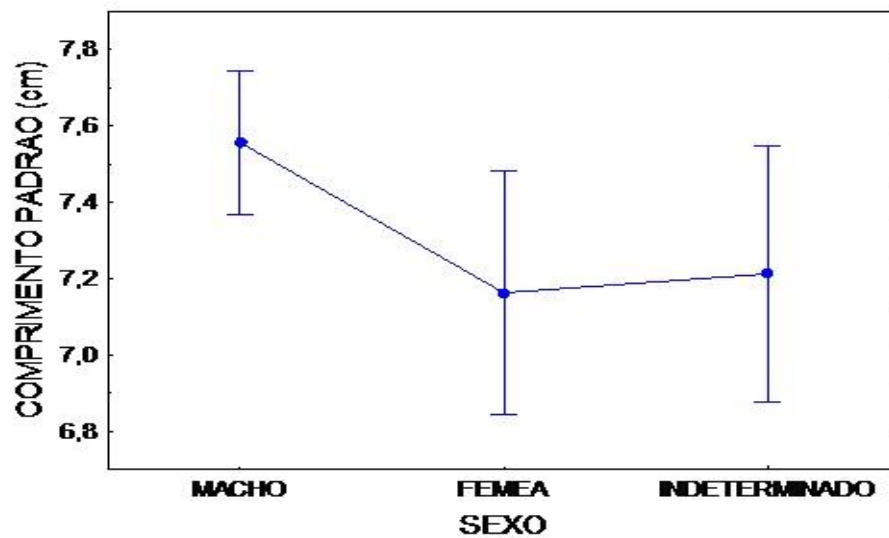


Figura 11 - Intervalos de comprimento padrão, dependendo do sexo da Tilápia a 35 ° C (masculino, feminino e indeterminado).

3.3 Análise de SSCP

Foram encontrados cinco padrões de bandas distintos nos tratamentos (T25 e T35).

O tratamento a 25°C apresentou os cinco padrões de banda (a, b, c, d, e), no entanto no tratamento a 35°C o padrão de banda denominado “e” não foi encontrado (Tabela 3).

O padrão denominado “b” foi mais freqüente em ambos os tratamentos, seguido do padrão “a”, “c”, “d” e o menos freqüente “e” com apenas 1,8% (Tabela 3).

O padrão “e” foi encontrado somente em machos do tratamento a 25°C.

Em ambos os tratamentos os machos apresentaram uma porcentagem de padrão de bandas maior que os encontrados nas fêmeas (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de padrão de bandas encontrado nos dois tratamentos (25°C e 35°C) a partir do 3º dia após a eclosão em *Oreochromis niloticus* – linhagem Supreme.

Padrões de bandas	25°C		35°C	
	Macho (%)	Fêmea (%)	Macho (%)	Fêmea (%)
Padrão a	53,4	52,2	53,7	47,1
Padrão b	62,9	34,8	74,1	52,9
Padrão c	31,4	30,4	40,8	29,4
Padrão d	9,2	21,7	9,3	11,7
Padrão e	1,8	0	0	0

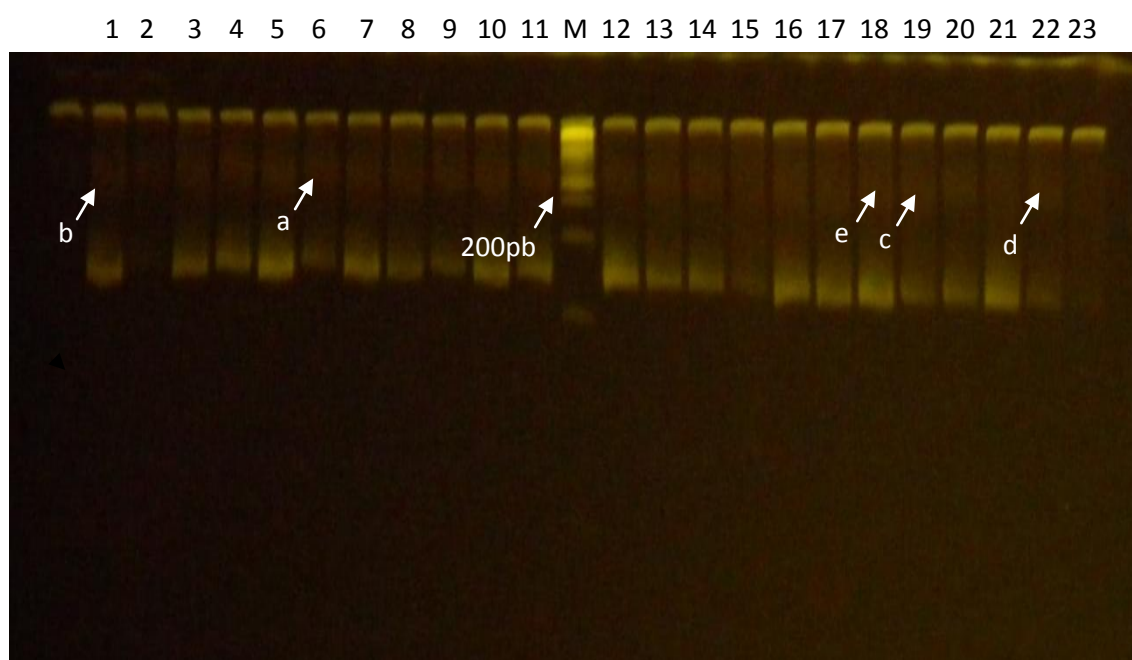


Figura 12 - Gel GMA Wide Mini S-2x25. Ready-to-Use Gels for SSCP and Heteroduplex Analysis. Análise do padrão de bandas encontradas na região regulatória do gene *CYP19a* de *Oreochromis niloticus*. Padrões a, b, c, d, e. Tratamento = 25°C. Amostras de 1 a 23 amostras, M = marcador GeneRuler DNA Ladder Mix.

4 Discussões

A taxa de mortalidade condiz com dados de Borges et al. (2005), apresentando-se menor no tratamento com temperatura mais alta (35°C), indicando que os peixes estão melhor adaptados a uma temperatura mais elevada do que na temperatura controle (27°C). Contudo Bezault et al. (2007) encontrou uma taxa de mortalidade maior em indivíduos tratados com 36°C do que a 27°C, obtendo 17% e 10%, respectivamente. Uma explicação para estas

divergências, pode ser o fato de Bezault et al (2007) ter trabalhado com três populações naturais da Etiópia sugerindo uma alta sensibilidade à temperatura de 36°C. Já Borges et al (2005) utilizaram uma linhagem melhorada geneticamente, a Chitralada.

Correlação entre medidas morfométricas

O fato de não ter sido encontrada correlação entre sexos diferentes ou indivíduos indeterminados indica que estes grupos são diferentes, ou seja, não há uma semelhança significativa entre as três medidas em ambos os sexos.

Contudo, considera-se que de um tratamento para outro não há correlação entre as medidas, porque os indivíduos são significativamente diferentes entre si.

Relação das medidas com o sexo.

Segundo os dados estatísticos, as medidas morfométricas (comprimento padrão e comprimento total) tomadas no tratamento T25 dos indivíduos não processados quando comparadas com as fêmeas não apresentam uma diferença significativa, portanto, é possível sugerir que estes indivíduos sejam fêmeas já que suas medidas encontram-se mais próximas destas do que de machos.

No tratamento T35, os resultados obtidos evidenciam uma homogeneidade entre as medidas morfométricas (comprimento padrão e comprimento total) de ambos os sexos, sendo inclusive os machos mais distantes das fêmeas do que dos indivíduos indeterminados.

Considerando as duas temperaturas foi obtido ao redor de 8% de indivíduos com sexo indeterminado (Tabela 2). A frequência de indivíduos indeterminados é evidente e ocorre naturalmente nos casos em que os animais sofreram processo incompleto de reversão sexual por temperatura (CARVALHO e FORESTI, 1996; PHELPS e POPMA, 2000).

Segundo Borges et al. (2005), a porcentagem de machos na temperatura de 35,1° C foi de 72,39%, o que equivale a uma proporção de 1 para 2,3 (fêmea:macho), bastante próxima ao obtido neste trabalho (1:2,88). Contudo, se for levado em consideração a porcentagem de indivíduos indeterminados e de indivíduos não processados, nosso estudo pode chegar a 77% de indivíduos machos, condizendo a estudos anteriores. Entretanto esta diferença de 25°C para 27°C utilizada por Borges et al., (2005) pode ter uma diferença significativa nos resultados de proporção dos sexos.

Considerando as duas temperaturas houve um viés em direção a produção de machos, sendo os machos mais do que o dobro das fêmeas (relação fêmea:macho de 1:2,3 para 25° C e 1:2,9 para 35° C). Conforme estudos de POPMA e GREEN (1990), as porcentagens de fêmeas encontradas em tratamentos de temperatura mais alta (acima de 30°C) devem ser bem menores do que a proporção de machos. É sugerido por alguns autores Yamaguchi et al., (2007) e Wang et al., (2007) que a exposição à alta temperatura durante o período termossensível suprimiu a expressão do gene *cyp19a1a* em espécies de peixes termossensíveis e, isso, pode ser resultado da baixa atividade da aromatase, que apresenta como consequência baixos níveis de E2. E a falta de estrogênio causada pela expressão gênica suprimida da aromatase, torna-se responsável pela masculinização de fêmeas genéticas (Socorro et al., 2007).

Há diferenças entre os padrões de bandas encontradas na região regulatória do gene *CYP19b* de *Oreochromis niloticus*.

Os padrões de banda “a”, “c”, “d” não são sensíveis a temperatura, pois em ambos os tratamentos suas frequências mantiveram-se constantes. Já o padrão “b” apresentou uma frequência maior em ambos os tratamentos e com um aumento nos indivíduos machos.

A aromatase ovariana desempenha um papel importante no mecanismo de determinação e de diferenciação dos sexos, é responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos. Sua expressão é ativada através de fatores de transcrição que se ligam sítios específicos de transcrição, portanto, polimorfismos presentes nesta região regulatória que afetem o nível de transcrição e consequentemente a síntese da aromatase causam uma alteração na diferenciação do sexo. Em face disto a busca por variantes alélicas que conduzam a uma maior supressão da aromatase contribuirão de forma acelerada para a melhora da linhagem a ser produzida. A seleção baseada diretamente no DNA é mais efetiva que a seleção tradicional, pois consegue sobrepor o problema originado pela segregação dos alelos nos diferentes *loci* na formação dos gametas.

As regiões flanqueadas para a análise do polimorfismo neste trabalho engloba alguns sítios de transcrição, como o fator de transcrição GATA 4 com domínios de dedos de zinco. Os membros desta família reconhecem a razão de ADN GATA, que está presente nos promotores de muitos genes. GATA4 parece regular genes implicados na embriogênese, na diferenciação e função do miocárdio. Outro fator de transcrição também flanqueado foi o SRY, ao qual é necessário para o desenvolvimento do testículo em mamíferos, e a sua deficiência pode resultar na reversão sexual em humanos do sexo masculino.

Embora os resultados tenham sido satisfatórios, é importante salientar a necessidade de aumentar a temperatura pós-período da janela de reversão e aumentar um pouco o período de crescimento até o sacrifício dos animais.

Para trabalhos futuros, sugere-se indivíduos monossexos (XX e XY), para que o processo de reversão seja completo e apresente uma baixa taxa de indivíduos indeterminados.

5. Conclusões

Através dos resultados encontrados, pode-se supor que o polimorfismo presente nesta porção da região regulatória pode estar relacionado à resposta na reversão sexual através da temperatura.

Contudo, é indispensável a clonagem e o seqüenciamento desta região regulatória do gene *CYP19a*, para que assim se possa definir a(s) mutações que se encontra nesta região. Uma análise correlacionando este polimorfismo e a expressão do gene da aromatase através de qRT-PCR também deverá ser realizada para confirmação de causa e efeito.

6. Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de auxílio e financiamentos.

7. Referências

- Almeida, D.B. Variação genética do marcador de microsatélite na região regulatória do hormônio de crescimento e prolactina em diferentes grupos genéticos de Tilápia do Nilo. 2008 (dissertação de mestrado).
- Beardmore, J. A., Mair, G. C., Lewis, R. I. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*. 197, 283-301.
- Bezault, E., Clota, F., Derivaz, M., Chevassus, B., Baroiller, J. F. 2007. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia

- (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture*. 272, S3-S16.
- Borges, A. M., Moretti, J. O. C., McManus, C., Mariante, A. S. 2005. Produção de população monossexo macho de Tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 40, 153-159.
- Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C.C., Nagahama, Y. 2005. Two types of aromatase with diverent encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*. 141, 101–115.
- Coveney, D., Shaw, G., Renfree, M. B. 2001. Estrogen-induced gonadal sex reversal in the tammar wallaby. *Biology of Reproduction*. 65, 613-621.
- Croxall, J. P. 1995. Sexual size dimorphism in seabirds. *Oikos* 73, 399–403.
- 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.
- Goudet, J. 2002. FSTAT version 2.9.3.2. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Available from <http://www.2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., Chang, C. F., 2009. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation end sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 10.1016.
- Kubitza, F. 2000. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F. Kubitza, 285p.
- Liu, Z. W. F., Jiao, B., Zhang, X., Hu, C., Huang, B., Zhou, L., Huang, X., Wang, Z., Zhang, Y., Nagahama, Y., Cheng, C. H., Wang, D. 2007. Molecular Cloning of doublesex and Mab-3 related transcription Factor1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *Journal Endocrinology*. 194, 223–241.
- Oliveira, P.A., Almeida, D. B. Avaliação da reversão sexual de alevinos de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) com o uso de Vorozol em estufa. 2008. In. XVI Congresso de Iniciação Científica. Pelotas. www.ufpel.tche.br/cic/2007/cd/pdf/CA/CA_00913.pdf.

- Ospina-Álvarez, N., Piferrer, F., 2008. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PloS ONE* 3 (7), e 2837. doi:10.1371/ journal.pone.0002837.
- Popma, T. J., Green, B. W. 1990. Sex reversal of tilapia in earthen ponds: aquaculture production manual. Alabama: Auburn University, 15p. (Research and Developmente Series, 35).
- Price, D.J. 1984. Genetics of sex determination in fishes—a brief review. In: Potts, G.G., Wootton, R.J. (Eds.), *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. Academic Press, London, 77–89.
- Smith, C. A., Sinclair, A. H. 2004. Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays*. 26, 120-132.
- Socorro, S., Martins, R.S., Deloffre, L., Mylonas, C.C., Canario, A.V.M., 2007. A cDNA for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) 11 beta-hydroxylase: Gene expression during the thermosensitive period and gonadogenesis. *General and comparative Endocrinology*, v. 150, p. 164–173.
- Tavares, L. H. S. *Limnologia aplicada à aqüicultura*. Jaboticabal: Finep, 1995. 70p.
- Tessema, M., Müller-Belecke, A., Hörstgen-Schwark, G. 2006. Effect of rearing temperatures on the sex-ratios of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture*. 258, 270–277.

6. Conclusões

Embora ocorra uma reversão por temperatura nesta linhagem estudada ela ainda não é total. Também foi detectado polimorfismo na região regulatória do gene *CYP19a* (aromatase ovariana), este polimorfismo pode estar relacionado com a sensibilidade à reversão ou não.

No gene *CYP19b* (aromatase cerebral) também apresentou polimorfismo, mas na região regulatória, onde este pode estar relacionado à produção de estrogênio e da sensibilidade à temperatura.

Considerando a tentativa de selecionar indivíduos que apresentem polimorfismo na região regulatória dos genes da aromatase (*CYP19a* e *CYP19b*), é indispensável um estudo para avaliar os níveis de expressão de ambos, para que se possa observar como está sendo expressado em indivíduos que revertem ou não, possibilitando assim a reversão por temperatura com uma proporção mais elevada.

7. Referências Bibliográficas

ABUCAY, J. S.; MAIR, G. C.; SKIBINSKI, D. O. F.; BEARDMORE, J. A. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 173, p. 219–234, 1999.

ARNOLD, A.P. Sex chromosomes and brain gender. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 701–708, 2004.

AZAZA, M. S.; DHRAÏEF, M. N.; KRAÏEM, M. M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, v. 33, p. 98 – 105, 2008.

BALARIN, J. D.; HATTON, J. P. **Tilápia: A guide to their biology and culture in África**. University of Stirling, Scotland, 1979.

BARAS, E.; JACOBS, B.; MÉLARD, C. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX–XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, **Aquaculture**, v. 192, p. 187–199, 2001.

BARAS, E.; PRIGNON, C.; GOHOUNGO, G.; MÉLARD, C. Phenotypic sex differentiation of blue tilapia under constant and fluctuating thermal regimes and its adaptative and evolutionary implications. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 88 -96, 2000.

BAROILLER, J. F.; CLOTA, F.; GERAZ, E. Temperature sex determination in two tilapia, *Oreochromis niloticus* and the Red tilapia (Red Florida strain): effect of high or low temperature. In: Goetz, F. W.; Thomas, P.(Eds), **Proceedings of the 5th**

International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, July 2-8, Austin, Texas, USA, p.158-160, 1995.

BAROILLER, J.F.; D'COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Physiology and Biochemistry**, Part C Pharmacol. Toxicol., v. 130, p. 399–409, 2001.

BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H.; SAILLANT, E. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. **Sexual Development**, v. 3, p. 118–135, 2009.

BAROILLER, J.F.; D'COTTA, H.; WESSELS, S.; BEZAULT, E.; HOERSTGEN-SCHWARK, G. Temperature effects on tilapia sex differentiation. Proceeding of the **6th International Symposium on Fish Endocrinology**, Calgary, Canada, June 22–27, 2008.

BAROILLER, J.F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 910–931, 1999.

BAROILLER, J. F.; NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; CHOURROUT, D. Sex determination studies in two species of teleost fish, *Oreochromis niloticus* and *Leporinus elongans*. **Zoology Study**, v. 35, p. 279-285, 1996.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, J. A.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. **Aquaculture**, v.197, p. 283-301, 2001.

BLAZQUEZ, M.; PIFERRER, F. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 219, p. 83–94, 2004.

BOMBARDELLE, R. A.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Aplicação de métodos diretos e indiretos para a produção de populações monossexuais na tilapicultura. **Arquivo de Ciência Veterinária e Zoologia. UNIPAR**, v. 7, p. 57-68, 2004.

BREATHNACH, R.; CHAMBON, P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, p. 351–359, 1981.

CARVALHO, E. D. **Indução da reversão de sexo em *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) com o uso do hormônio masculinizante 17 α metiltestosterona: frequência de machos e crescimento.** São Carlos, 1985. 166f. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Depto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.

CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, induzida por 17-alfa-metiltestosterona: proporção de sexo e histologia das gônadas. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, p. 249-262, 1996.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce.** Jaboticabal:Funep, 1992, 189p.

CHANG, X.; KOBAYASHI, T.; KAJURA, H.; NAKAMURA, M.; NAGAHAMA, Y. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 18, p. 57–66, 1997.

CHANG, X.; KOBAYASHI, T.; SENTHILKUMARAN, B.; KOBAYASHI-KAJURA, H.; SUDHAKUMARI, C. C.; NAGAHAMA, Y. Two types of aromatase with diverent encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 141, p. 101–115, 2005.

CHIANG, E. F.; YAN, Y. L. TONG, S. K.; HSIAO, P. H.; GUIGUEN, Y.; POSTLETHWAIT, J.; CHUNG, B. C. Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, p. 709-714, 2001.

CHOI, I.; SIMMEN, R. C.; SIMMEN, F. A. Molecular cloning of cytochrome P450 aromatase complementary deoxyribonucleic acid from periimplantation porcine and equine blastocysts identifies multiple novel 5-untranslated exons expressed in embryos, endometrium, and placenta. **Endocrinology**, v. 137, p. 1457–1467, 1996.

CREWS, D.; FLEMING, A.; WILLINGHAM, E.; BALDWIN, R.; SKIPPER, J.K. Role of steroidogenic factor 1 and aromatase in temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, p. 597–606, 2001.

D'COTTA, H.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y.; GOVOROUN, M.; BAROILLER, J.F. Search for the molecular mechanisms implicated in the thermosensitivity of sex gonadal differentiation of tilapia fish: differential approach and expression of candidate genes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, p. 574–585, 2001.

D'COTTA, H.; PEPEY, E.; PFENNIG, F.; BIENVENU, D.; GUTZEIT, H. O.; VOLFF, J. N.; WENNING, M.; BAROILLER, J. F. *Sox9a*, *Sox9b* and *Amh* are up-regulated in the gonads during natural and temperature-induced tilapia male differentiation. Proceedings of the **8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish**, June 3rd–8th, Saint-Malo, France, 2007.

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

DONALDSON, E. M. Manipulation of reproduction in farmed fish. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 381–392, 1996.

EZAZ, T. M.; MYERS, J. M.; POWELL, S.F.; MCANDREW, B. J.; PENMAN, D. J. Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 232, p. 205-214, 2004.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department, Roma, 2009. 196p.

FRANCIS, R.C. Sexual lability in teleosts: developmental factors. **Quarterly Review of Biology**, v. 7 (1), p. 1–17, 1992.

GALLI, L. F.; TORLONI, C. E. C. **Criação de Peixes**. 3 ed. São Paulo: Nobel, 1986. 118p.

GELINAS, D.; PITOC, G. A. CALLARD. G. V. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 16, p. 81–93, 1998.

GOVOROUN, M.; S.; PANNETIER, M.; PAILHOUX, E.; COCQUET J.; BRILLARD, J.; P.; COUTY, I.; BATELLIER, F.; COTINOT, C. Isolation of chicken homolog of the *Foxl2* gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. **Developmental Dynamics**, v. 231, p. 859–870, 2004.

GRADDY, L. G.; KOWALSKI, A. A.; SIMMEN, F. A.; DAVIS, S. L. F.; BAUMGARTNER, W. W.; SIMMEN, R. C. M. Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 73, p. 49–57, 2000.

GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A.; PIFERRER, F.; CHANG, C. F. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 352–366, 2010.

HARVEY, S. C.; KWON, J. Y.; PENMAN, D. J. Physical mapping of the brain and ovarian aromatase genes in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, by Fluorescence in situ hybridization. **Animal Genetics**, v. 34, p. 62–64, 2003.

HACKER, A.; CAPEL, B.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BADGE, R. Expression of *Sry*, the mouse sex-determining gene. **Development**, v. 121, p. 1604–1614, 1995.

IBAMA. Estatística da pesca 2007 Brasil: grandes regiões e unidades da federação, Brasília, 2008. 174p.

IJIRI, S.; BERARD, C.; TRANT, J. M. Characterization of gonadal and extra-gonadal forms of the cDNA encoding the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) cytochrome P450 aromatase. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 164, p. 169–181, 2000.

IJIRI, S.; KANEKO, H.; KOBAYASHI, T.; WANG, D.; S.; SAKAI, F.; PAUL-PRASANTH, B.; NAKAMURA, M.; NAGAHAMA, Y. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 333–341, 2008.

JALABERT, B.; MOREAU, J.; PLANQUETTE, P.; BILLARD, R. Déterminisme du sexe chez *Tilapia macrochir* et *Tilapia nilotica*: action de la méthyltestostérone dans l'alimentation des alevins sur la différenciation sexuelle; proportion des sexes dans la descendance des mâles "inversés". **Annales Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 14 (4-B), p. 729–739, 1974.

KISHIDA, M.; CALLARD, G. V. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are diverentially programmed and estrogen regulated during early development. **Endocrinology**, v. 142, p. 740–750, 2001.

KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. **Cytogenet Genome Research**, v. 101, p. 289–294, 2003.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285p.

KWON, J. Y.; HAGHPANAH, V.; KOGSON-HURTADO, L. M.; MCANDREW, B. J.; Penman, D. J. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, p. 46–53, 2000.

KWON, J.Y.; MCANDREW, B.; PENMAN, D.J. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Molecular Reproduction**, v. 59, p. 359–370, 2001.

LEHNINGER, A.; L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica**. São Paulo: Sarver Editora de Livros Médicos Ltda, 1995.

LEI, N.; HECKERT, L. L. Gata 4 Regulates Testis Expression of Dmrt1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, p. 377-388, 2004.

LEONHARDT, J. H. **Efeito da Reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus***. 1997. 141f. Tese (Doutorado em Aquicultura)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

LESTER, L. J.; LAWSON, K. S.; ABELLA, T. A.; PALADA, M. S. Estimated heritability of sex ratio and sexual dimorphism in tilapia. **Aquacult Fish Manage**, v. 20, p. 369–380, 1989.

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**, v. 36, p. 223-235 2008.

LOFFLER, K. A.; ZARKOWER, D.; KOOPMAN, P. Etiology of ovarian failure in blepharophi-mosis ptosis epicanthus inversus syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene invertebrate ovarian development. **Endocrinology**, v. 144, p. 3237–3243, 2003.

LUND, V. X.; FIGUEIRA, M. L. O. A. **Criação de Tilápias**. São Paulo: Nobel, 1986. 118p.

MAGERHANS A.; MÜLLER-BELECKE A.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Effect of rearing temperatures post hatching on sex ratios of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations. **Aquaculture**, v. 294, p. 25–29, 2009.

MAIR, G. C.; SCOTT, A. G.; PENMAN, D. J.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F. Sex determination in the genus *Oreochromis*: I. Sex reversal, gynogenesis and triploidy in *O. niloticus* (L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 82, p. 144– 152, 1991.

MALDONADO, L. C. T.; PIEDRA, A. L.; MENDOZA, N. M.; VALENCIA, A. M.; MARTÍNEZ, a. M.; LARIOS, H. M. Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, p. 20-26, 2002.

MATSUOKA, M.P.; VAN NES, S.; ANDERSEN, O.; BENFEY, T.J.; REITH, M. Real-time PCR analysis of ovary- and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) development. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 128–135, 2006.

MOREIRA, H. L. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; ERDTMANN, B. Levels of inbreeding and relatedness in breeder stocks of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) detected by

microsatellite analysis. In: Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 2000, Rio de Janeiro. p. 59-67.

MORINAGA, C.; SAITO, D.; NAKAMURA, S.; SASAKI, T.; ASAKAWA, S.; SHIMIZU, N.; MITANI, H.; FURUTANI-SEIKI, M.; TANAKA, M.; KONDOH, H. The *hotei* mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 9691–9696, 2007.

MORRISON, C.M.; MIYAKE, T.; WRIGHT Jr. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Journal Morphology**, v. 247, p. 172–195, 2001.

NES, S.; ANDERSEN, O. Temperature effects on sex determination and ontogenetic gene expression of the aromatases *cyp19a* and *cyp19b*, and the estrogen receptors *esr1* and *esr2* in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1481–1490, 2006.

OLIVEIRA, P. A.; HEIN, G.; ALMEIDA, D. B.; COSTA, M. A. P.; MOREIRA, C. G. A.; SILVA, J. C.; TAVARES, R. A.; TEIXEIRA, F.; MANZKE, V. H. B.; MOREIRA, H. L. M. Avaliação da Reversão Sexual de Alevinos de Tilápias (*Oreochromis Niloticus*) com o uso de Vorozol em estufa. In: XVI Congresso de Iniciação Científica, 2008, Pelotas, **Anais do XVI CIC da Universidade Federal de Pelotas**, 2008, p. 1-5.

OSPINA-ÁLVAREZ, 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* 3 (7), e 2837. doi:10.1371/ journal.pone.0002837, 2008.

OVIDIO, M.; DESPREZ, D.; MÉLARD, C.; PONCIN, P. Influence of sexual genotype on the behaviour of females (genotype WZ) and pseudofemales (genotype ZZ) in the tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquatic Living Resources**, v. 15, p. 163–167, 2002.

PARKER, K. L.; SCHEDL, A.; SCHIMMER, B. P. Gene interactions in gonadal development. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 417–433, 1999.

PENMAN, D. J.; SHAH, M. S.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F. Sex ratios of gynogenetic and triploid tilapia. Sel. Hybrid. **Genetic Engineering of Aquaculture**, v. 18, p. 18–19, 1987.

PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex Reversal of Tilapia. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J. E. (Ed.). **Tilapia aquaculture in the Americas**. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. v.2, p.34-59.

PIFERRER, F.; DONALDSON, E. M. Dosage-dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 9, p. 145–150, 1991.

PIFERRER, F.; NAVARRO-MARTÍN, L.; OSPINA-ÁLVAREZ, N.; BLÁZQUEZ, M.; VIÑAS, J. Temperature-dependent sex determination in fish, effects of temperature on gonadal aromatase gene expression, and epigenetic regulation after early exposure to high water temperature. **Proc. Sixth International Symposium Fish Endocrinology**. Calgary, June 22–27, p. 63 (Abstract). 2008.

POPMA, T. J.; GREEN, B. W. **Sex reversal of tilapia in earthen ponds: aquaculture production manual**. Alabama: Auburn University, 1990. 15p.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. **Worldwide Prospects for Commercial Production of Tilapia**, International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Auburn: Auburn University, Alabama. Research and Development. Series n. 41, 1996. 23 p.

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

ROWELL, C. B.; WATTS, S. A.; WIBBELS, T.; HINES, G. A.; MAIR, G. Androgen and estrogen metabolism during sex differentiation in mono-sex populations of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, p. 151–162, 2002.

SAKAI, F., KOBAYASH, T., MATSUDA, M., NAGAHAMA, Y. Stability in aromatase immunoreactivity of steroid-producing cells during early development of XX gonads of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: an organ culture study. **Zoological Science**, v. 25, p. 344–348, 2008.

SCHALBURG, K. R.; YASUIKE, M.; Davidson, W. S.; KOOP, B. F. Regulation, expression and characterization of aromatase (cyp19b1) transcripts in ovary and testis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. b, p. 8, 2009.

SCOTT, A. G.; PENMAN, D. J.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F. The “YY” supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture. **Aquaculture**, v. 78, p. 3– 4, 1989.

SOCORRO, S.; MARTINS, R.S.; DELOFFRE, L.; MYLONAS, C.C.; CANARIO, A.V.M. A cDNA for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) 11 beta-hydroxylase: Gene expression during the thermosensitive period and gonadogenesis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 150, p. 164–173, 2007.

STRÜSSMANN, C. A.; NAKAMURA, M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. **Fish physiology and biochemistry**, v. 26, p. 13–29, 2002.

SUZUKI, A.; TANAKA, M.; SHIBATA, N.; NAGAHAMA, Y. Expression of aromatase mRNA and effects of aromatase inhibitor during ovarian development in the medaka, *Oryzias latipes*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 301, p. 266–273, 2004.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum**, v. 26, p. 305–311, 2004.

TCHOUDAKOVA, A.; CALLARD, G. V. Identification of multiple CYP 19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. **Endocrinology**, v. 139, p. 2179–2189, 1998.

TERASHIMA, M.; TODA, K.; KAWAMOTO, T.; KURIBAYASHI, I.; OGAWA, Y.; MAEDA, T.; SHIZUTA, Y. Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P450. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 285, p. 231–237, 1991. TESSEMA, M.; MÜLLER-BELECKE, A.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. **Aquaculture**, v. 258, p. 270–277, 2006.

TEVOSIAN, S. G.; ALBRECHT, K. H.; CRISPINO, J. D.; FUJIWARA, Y.; Eicher, E. M.; Orkin, S. H. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. **Development**, vol. 129, p. 4627–4634, 2002.

TONG, S. K.; CHIANG, E. F.; HSIAO, P. H.; CHUNG, B. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebraWsh cyp19 (P450 aromatase) genes. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 79, p. 299–303, 2001.

TRANT, J. M.; GAVASSO, S.; ACKERS, J.; CHUNG, B. C.; PLACE, A. R. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Zoology** v. 290, p. 475–483, 2001.

TSAI, C.-L.; CHANG, S.-L.; WANG, L.-H.; CHAO, T.-Y. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, p. 97–102, 2003.

VAN DEN HURK, R.; LAMBERT, J.G.D. Temperature and steroid effects on gonadal sex differentiation in rainbow trout. In: Richter, C.J.J., Goos, H.J.T. (Eds.), **Proceeding of the International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. 2–6 August, 1982, Pudoc., Wageningen, pp. 69–72, 1982.

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

WANG, D.; S.; KOBAYASHI, T.; ZHOU, L.; NAGAHAMA, Y. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Biochemistry and Biophysical**, v. 320, p. 83-89, 2004.

WANG, D.; S.; KOBAYASHI, T.; ZHOU, L.; Y.; PAUL-PRASANTH, B.; IJIRI, S.; Sakai, F.; OKUBO, K.; MOROHASHI, K.; NAGAHAMA, Y. *Foxl2* up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 712–725, 2007.

WANG, D. S.; NAGAHAMA, Y. *DMRT1* represses *AD4BP/SF1/FOXL2* activated aromatase gene transcription: a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. In: **Sixth International Symposium Fish Endocrinology, 2008**. Calgary, June 22– 27, 2008, p. 62.

WANG, L. H.; TSAI, C. L. Temperature affects the development of central neurotransmitter systems of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Neuroscience Letters**, v. 285, p. 95-98, 2000.

WANG, D. S.; ZHOU, L. Y.; KOBAYASHI, T.; MATSUDA, M.; YASUSHI, S.; SAKAI, F.; NAGAHAMA, Y. Doublesex-and Mab-3 Related Transcription Factor-1 Repression of Aromatase Transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. **Endocrinology**, v. 151, p. 1331-1340, 2010.

WOHLFARTH, G. W.; WEDEKIND, H. The heredity of sex determination in tilapias. **Aquaculture**, v. 92, p. 2 –3, 1991.

YAMAGUCHI, T.; YAMAGUCHI, S.; HIRAI, T.; KITANO, T. Follicle-stimulating hormone signaling and *Foxl2* are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in *Japanese flounder, Paralichthys olivaceus*. **Biochemistry and Biophysical**, v. 359, p. 935–940, 2007.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: HOAR, W.; RANDALL, D. (Eds.), **Fish Physiology**. Academic Press, p. 117– 175, 1969.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, v. 33, p. 329-354, 1983.

YAO, H. H.; MATZUK, M. M.; JORGEZ, C. J.; MENKE, D. B.; PAGE, D. C.; SWAIN, A.; CAPEL, B. Follistatin operates downstream of *Wnt4* in mammalian ovary organogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 230, p. 210–215, 2004.

YOSHIURA, Y.; SENTHILKUMARAN, B.; WATANABE, M.; OBA, Y.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y. Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1545–1553, 2003.