



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Jonathan Pena Castro

**EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS À DETERMINAÇÃO SEXUAL EM *Astyanax*
scabripinnis (TELEOSTEI: CHARACIDAE) em animais com e sem cromossomos B**

Tese de Doutorado

Orientador: **Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni**

Co-orientador: **Prof. Dr. Ricardo Shohei Hattori**

SÃO CARLOS, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Jonathan Pena Castro

EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS À DETERMINAÇÃO SEXUAL EM *Astyanax scabripinnis* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) em animais com e sem cromossomos B

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução, sob orientação do Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni e co-orientação do Prof. Dr. Ricardo Shohei Hattori

Orientador: **Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni**

Co-orientador: **Prof. Dr. Ricardo Shohei Hattori**

SÃO CARLOS, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Jonathan Pena Castro, realizada em 01/03/2019:

Prof. Dr. Roberto Ferreira Antoni
UEPG

Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo
UFSCar

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
UFSCar

Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto
UNESP

Prof. Dr. George Shigueki Yasui
USP

Identificação Bibliográfica

Nome: **Jonathan Pena Castro**

Título da Tese: **EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS À DETERMINAÇÃO SEXUAL EM *Astyanax scabripinnis* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) em animais com e sem cromossomos B.**

Título da Tese em Inglês: **EXPRESSION OF CANDIDATES GENES FOR SEX DETERMINATION IN *Astyanax scabripinnis* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) in animals with and without B chromosomes.**

Programa de estudo: **Genética Evolutiva e Biologia Molecular**

Orientador: **Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni**

Co-orientador: **Prof. Dr. Ricardo Shohei Hattori**

Ano de início: **2014**

Ano da defesa: **2019**

Palavras-chave: **Diferenciação sexual, hibridação *in situ* fluorescente, determinação sexual, *dmrt1*, *foxl2*, *amh*.**

Keywords: **Sexual differentiation, fluorescent *in situ* hybridization, sex determination, *dmrt1*, *foxl2*, *amh*.**

Dedico aos meus pais, com todo o carinho,

Joselia Pena Castro (in memoriam) e

Rene Pena Castro Jr.

*Sit down before fact like a little child, and
be prepared to give up every preconceived
notion, follow humbly wherever and to
whatever abyss Nature leads or you shall
learn nothing.*

Thomas Henry Huxley

*No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio
termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.*

Ayrton Senna

*The saddest aspect of life right now is
that science gathers knowledge faster
than society gathers wisdom.
Isaac Asimov*

Agradecimentos

Aproveito esta seção para deixar meus sinceros agradecimentos a todos que participaram, direta ou indiretamente, na concretização deste trabalho. Particularmente, agradeço:

Aos meus amados pais, Joselia Pena Castro (*in memoriam*) e Rene Pena Castro Jr. Eu sou o que sou graças a vocês. Eu dedico e devo tudo o que conquistei graças aos esforços, batalhas e sacrifícios de vocês, que me ensinaram desde pequeno a ser uma pessoa dedicada, esforçada e estudiosa. Nunca deixaram de apoiar minhas escolhas e sempre fizeram o melhor que puderam, buscando dar sempre as melhores condições, em todas as situações. Sou eternamente grato. Muito obrigado!

Ao meu orientador, prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grato a tudo que aprendi, a importância na construção da minha caminhada pessoal e profissional, à confiança e parceria produtiva; às oportunidades e sempre disposição em conversar, aconselhar, procurar soluções, saber ouvir, e tudo sempre com muito otimismo e vontade de trabalhar. Um grande ser humano, qualidade que está em falta na academia e na sociedade. Considero-o uma referência e uma fonte de inspiração. Considero-o também um excelente orientador/pesquisador e um dos meus melhores amigos. Meu muito obrigado!

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) pela oferta do doutorado. Sem ele, este trabalho não existiria.

Ao LabGEv – Laboratório de Genética Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), por toda a infraestrutura e suporte oferecido. Aos queridos professores do Laboratório, prof. Dr. Mateus Henrique Santos e Profa. Dr. Mara Cristina de Almeida, pelas sugestões, auxílios, conselhos e parcerias, prontamente dispostos a ajudar. Ao técnico Miguel Airton Carvalho por estar sempre disposto, seu bom humor, e sempre arrumar um jeito de “quebrar o galho” quando algo não funcionava ou não ia do jeito que era o esperado. Meu muito obrigado!

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Ricardo Shohei Hattori, da Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão – SP, por ter me recebido em seu laboratório e ter aceitado a co-orientação, além da parceria, confiança e disponibilidade para sanar as minhas dúvidas sempre que precisava. Também à Dra. Yara Aiko Tabata e à toda equipe da Estação, por terem me recebido de braços abertos. São pessoas

inspiradoras que amam o que fazem e têm boa vontade e disposição para trabalhar. A sociedade precisa de mais gente assim.

Ao meu amigo Túlio Teruo Yoshinaga, da Estação Experimental, que muito auxiliou na pesquisa, ajudou em coletas, foi parceiro para trocar ideias, sugestões e dúvidas, sempre disposto e com muito bom humor. É amizade que fiz através do doutorado e permanece para a vida.

A todos meus amigos que continuam ou passaram pelo LabGEv, Luz Elena de la Ossa, Gabriel Marra, Dayane Niedzielski, Miguel Angel Soto, Angelita Barth, Zelinda Schemczssen, Alceu Ferreira Jr, Augusto Ferreira, Daniel Meneguello Limeira, Felipe Faix Barby, Jhon Alex, William Guilherme Gross, Bruno Kubis. Sou muito grato às trocas de experiências, conversas, parcerias, aos momentos de descontração, e à amizade, que levarei para a vida.

À minha namorada, Fernanda Haracemiv, por estar sempre ao meu lado, em todas as situações, boas e ruins, e ser complacente com minhas manias e defeitos, além de aguentar minhas constantes piadas ruins. Agradeço pela compreensão e cumplicidade. Muito obrigado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa de estudos concedida - Código de Financiamento 001.

E por fim, um dos princípios que sigo é que não realizamos nada sozinhos, e vejo isso ainda mais pontual na ciência. Todo conhecimento novo é gerado a partir de contribuições prévias, com uma soma de esforços de muitas pessoas. Assim, por mais que eu tente sumarizar – e nomear – cada pessoa que participou na construção deste trabalho, creio que falharei imensamente.

Assim, aos que não foram mencionados aqui e que de alguma forma, auxiliaram na minha formação pessoal e profissional e tornaram possível a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JONATHAN PENA CASTRO – Iniciou sua graduação na Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, graduando-se em dezembro de 2008. Durante a graduação realizou várias atividades extracurriculares, estágios na UEPG e em outras instituições como a UFPR (Universidade Federal do Paraná), Instituto Butantã e SEMA-PR (Secretaria do Estado do Meio Ambiente), e bolsista de duas Iniciações Científicas sob a orientação da Prof. Dra. Julianne Milléo, conduzindo um projeto de ciclo de vida e redescrição de um coleóptero. Considerando somente os trabalhos realizados na graduação, obteve seis artigos publicados em coautoria. Em 2010, ingressou no mestrado pelo Programa de Pós – Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) sob orientação do Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG) com a dissertação intitulada “Aspectos evolutivos e diferenciação de populações de *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Incertae sedis)”. Durante o mestrado desenvolveu habilidades para pesquisa em citogenética de peixes e genética molecular, sendo dado continuidade na área ingressando no doutorado. Em 2014, iniciou o doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), também sob orientação do Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni e co-orientação do Prof. Dr. Ricardo Shohei Hattori. Durante o doutorado seguiu os estudos com os aspectos evolutivos na espécie, mais especificamente na determinação do sexo.

Durante o mestrado e doutorado, participou de projetos de pesquisas coordenados pelo seu orientador. Apresenta até o momento, 18 artigos científicos (incluindo os em coautoria), sendo 12 artigos publicados na área de Genética e Evolução. Atualmente é professor de Biologia no magistério do ensino médio na rede pública do Estado do Paraná.

Resumo

Os peixes são animais presentes em uma grande variedade de habitats e estão distribuídos pelo mundo todo. A diversidade de formas, comportamentos e nichos, associados às características evolutivas destes animais os tornam importantes ao estudo associados à evolução da determinação e diferenciação sexual. Entre os peixes de água doce mais representativos da região Neotropical, os lambaris do gênero *Astyanax* ocupam destaque. O complexo de espécies *A. scabripinnis* é um dos mais estudados quanto à origem, distribuição e frequência de cromossomos B, sendo considerado um organismo modelo para estudos evolutivos. Vários estudos com inferências populacionais acerca da ocorrência e frequência de cromossomos B mostram haver variação sazonal entre os sexos, associada com a presença destes elementos supranumerários em *A. scabripinnis*. A hipótese aqui postulada é de que os cromossomos B possam ter alguma influência em relação aos processos reprodutivos dessa espécie. Assim sendo, o presente trabalho objetivou inferir se há diferenças entre os níveis de expressão gênica dos principais genes candidatos à determinação sexual, conhecidos para outros vertebrados, frente a ocorrência de cromossomos B em *A. scabripinnis*. Os resultados obtidos mostram superexpressão do gene *dmrt1* em gônadas masculinas em maturação de animais com cromossomos B. Já para os genes *amh* e *foxl2* os resultados mostram expressão atípica para as fêmeas que são portadoras de cromossomos B. Estas fêmeas apresentam padrões de expressão destes genes mais semelhantes ao dos machos e inverso ao das fêmeas que não carregam os cromossomos adicionais. As gônadas masculinas foram mais conservadoras em relação a expressão dos genes *amh* e *foxl2*, independente do estágio de maturação e da ocorrência de cromossomo B. A partir destes resultados conclui-se que a presença de cromossomos B, de alguma maneira, está alterando os perfis de expressão dos principais genes relacionados ao sexo, sugerindo-se um possível papel adaptativo nos animais portadores dos cromossomos B na extensão do ciclo reprodutivo.

Palavras-chave: Peixes, cromossomos supranumerários, diferenciação sexual, genes, *dmrt1*, *foxl2*, *amh*..

Abstract

Fish are animals present in a wide variety of habitats and are distributed all over the world. The diversity of forms, behaviors and niches associated with the evolutionary characteristics of these animals make them important to the studies associated sex determination and sexual differentiation. Among the freshwater fish of the Neotropical region, the tetras of the genus *Astyanax* are one of most representatives. The *A. scabripinnis* species complex has been well studied about the origin, distribution and frequency of B chromosomes, being considered a model organism for evolutionary studies. Several studies with population inferences about the occurrence and frequency of B chromosomes show a seasonal variation between the sexes associated with the presence of supernumerary elements in *A. scabripinnis*. The hypothesis is that B chromosomes could have a possible influence on the reproductive processes of this species. Thus, the present study aimed to infer if there are differences in the levels of gene expression between specimens carrying and not carrying B chromosomes concerning some candidate genes for sex determination. The results obtained showed an over expression of the *dmrt1* gene in maturing male gonads of animals with B chromosomes. For *amh* and *foxl2* genes occurred an atypical expression in females carrying B chromosomes, where their expression patterns were more similar to those of males and the reverse to those of females that do not carry Bs. The male gonads were more conservative in relation to the expression of the *amh* and *foxl2* genes, regardless of the maturation stage and the occurrence of the B chromosomes. These results indicate that B chromosomes are changing the profiles of the sex related genes, suggesting a possible adaptive role in extending the reproductive cycle.

Keywords: Fishes, supernumerary chromosomes, sexual differentiation, *dmrt1*, *foxl2*, *amh*.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 - Principais eventos que levam à diferenciação testicular e ovariana em peixes 3

Material e Métodos

Figura 2 - Exemplar de *Astyanax scabripinnis*. Barra = 1 cm..... 16

Figura 3 - Mapa com a localização da região de coleta..... 17

Capítulo 1

Figure 1-. Histological sections of *Astyanax scabripinnis* gonads. (a) male, (b) female, (c) hermaphrodite male gonad part, (d) hermaphrodite female gonad part Graphs (e) and (f) highlight between-group differences in *dmrt1* expression, based on qRT-PCR analysis. 30

Figure 2 -. Whole chromosome painting with microdissected B-chromosome probe. Bar: 10 μ m. 31

Capítulo 2

Figura 1- Níveis de expressão relativa de *amh* e *foxl2* em gônadas em maturação e maduras de *A. scabripinnis* adultos. 39

LISTA DE TABELAS

Material e Métodos

Tabela 1 - <i>Primers</i> desenhados e utilizados em PCR convencional, para padronização e confirmação de sequência.....	17
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados na qRT-PCR.....	18
Tabela 3 - Quantidade de exemplares utilizados na análise de expressão gênica.....	19

Capítulo 1

Table 1- Statistical analysis (ANOVA with Tukey's tests) of <i>dmrt1</i> expression in female, male, and hermaphrodite gonads of <i>Astyanax scabripinnis</i> with or without B chromosome.	29
--	----

Capítulo 2

Tabela. 1 <i>Primers</i> desenhados usados para PCR convencional e qRT-PCR.....	38
Tabela. 2 Quantidade de indivíduos utilizados na análise de expressão gênica.....	38
Tabela. 3 Análises estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais da determinação do sexo em peixes	2
1.2 O modelo evolutivo do complexo <i>Astyanax scabripinnis</i> – aspectos gerais, sistemáticos e citogenéticos	6
1.3 Cromossomos B e inferências populacionais em <i>A. scabripinnis</i>	8
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Amostras e locais de coleta	11
3.2 Histologia	11
3.3 Extração de DNA	12
3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA	12
3.5 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	13
3.6 Citogenética convencional	14
3.6.1 Preparação dos cromossomos mitóticos	14
3.7 Citogenética molecular	15
3.7.1 Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente	15
3.8 Figuras e tabelas	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
CAPÍTULO 1 - Differential expression of <i>dmrt1</i> in <i>Astyanax scabripinnis</i> (Teleostei, Characidae) is correlated with B chromosome occurrence	21
CAPÍTULO 2 - Expressão diferencial de genes relacionados à determinação sexual pode alterar o ciclo reprodutivo de <i>Astyanax scabripinnis</i> (Characiformes: Characidae) em indivíduos portadores de cromossomos B	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
7. ANEXO	53

1. INTRODUÇÃO

Os peixes, organismos considerados basais na filogenia dos vertebrados, geram muito interesse para estudos evolutivos. Além da ampla diversidade de formas, comportamentos e nichos, observa-se igualmente uma grande variação em relação a seus aspectos reprodutivos. A compreensão da determinação e diferenciação sexual em peixes pode fornecer dados relacionados às pressões evolutivas que moldaram os diferentes caminhos da determinação sexual em vertebrados (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Além da pesquisa básica, dá suporte a estudos aplicados, relacionados à biologia populacional, a influência das mudanças climáticas ou ecotoxicológicas e ao desenvolvimento de tecnologias de controle de sexo em espécies comercialmente importantes. Entre os peixes de água doce mais representativos da região Neotropical, os lambaris do gênero *Astyanax* ocupam destaque, pois além de serem um dos mais especiosos, contando com mais de 255 espécies válidas (ESCHEMEYER, 2018), também são amplamente distribuídos, em uma área que abrange a fronteira do México com os Estados Unidos, até o sul da Argentina (BRITSKI, 1972). São peixes que apresentam diversidade morfológica e genética, o que confere a ocorrência de vários “complexos de espécies” (ARTONI et al., 2006; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991). O complexo de espécies *A. scabripinnis* é um dos mais estudados quanto à origem, distribuição e frequência de cromossomos B, sendo considerado um organismo modelo para estudos evolutivos (MOREIRA-FILHO; GALETTI; BERTOLLO, 2004). Em diversos trabalhos (MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1994; PORTO-FORESTI et al., 1997; SILVA et al., 2014; VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 1996), já foi relatado uma distorção da razão sexual frente a ocorrência desses cromossomos. Na maioria das populações, os cromossomos B são macro cromossomos semelhantes em tamanho e forma ao maior par do cariótipo e quase totalmente heterocromáticos. Até o momento, não se sabe qual a real influência desses cromossomos ao organismo. Adicionalmente, as espécies de *Astyanax* possuem cariótipos indiferenciados entre os sexos e nenhuma informação dos genes sexo determinantes está disponível correlacionando a presença de cromossomos B na determinação sexual. Nesse sentido, o presente trabalho é pioneiro no Brasil em caracterizar a expressão de genes candidatos à determinação sexual frente à ocorrência de cromossomos B numa espécie de peixe modelo Neotropical.

1.1 Aspectos gerais da determinação do sexo em peixes

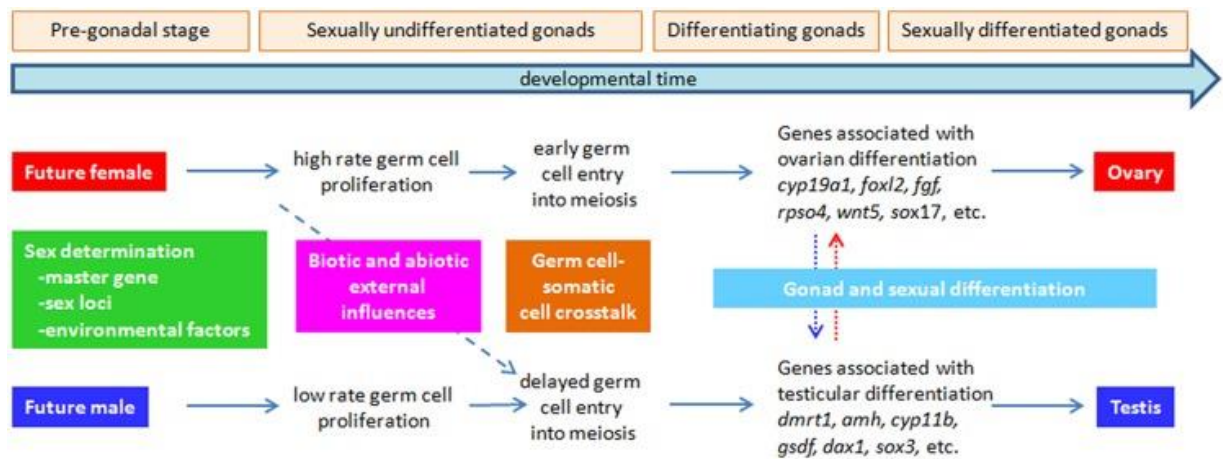
Os peixes são organismos que ocupam uma ampla variedade de habitats aquáticos distribuídos pelo mundo, constituindo mais de 33.700 espécies descritas (FROESE; PAULY, 2018). A maior parte da ictiofauna é encontrada em águas quentes tropicais, em especial a América do Sul, que possui uma das maiores biodiversidades do planeta, com aproximadamente 25% das espécies (VARI; MALABARBA, 1998). Essa região, que corresponde a zona ecológica Neotropical, há mais de 4.500 espécies de peixes de água doce descritas, distribuídas em 71 famílias e ainda, cerca de 1500 espécies a serem validadas (REIS; O; FERRARIS, 2003).

O Brasil é considerado um país de referência em termos de megadiversidade da ictiofauna, possuindo também a maior rede hidrográfica do mundo (GRAÇA; PAVANELLI, 2007), com praticamente o mesmo número de espécies encontrado para toda região Neotropical (FROESE; PAULY, 2018). A grande diversidade e riqueza em espécies é observada também na variedade das características biológicas desses organismos. A diversidade de formas, comportamentos e nichos, associados às características evolutivas destes animais os tornam importantes ao estudo associados à evolução da determinação e diferenciação sexual.

Considerando as estratégias reprodutivas, os peixes podem ser sexualmente categorizados como gonocoristas (quando os indivíduos possuem ovário e testículo em indivíduos distintos, sendo que uma vez determinado o sexo, este não se altera mais ao longo da vida); hermafroditas sequenciais (quando os indivíduos adultos apresentam um ou outro sexo e posteriormente podem reverter ao sexo oposto); hermafroditas sincrônicos (quando os indivíduos adultos apresentam gônadas com tecidos de ambos os sexos) ou unissexuais (quando as populações são compostas apenas por fêmeas) (TRUKHINA et al., 2013).

Quanto aos mecanismos de determinação e diferenciação do sexo, o processo de determinação sexual geralmente ocorre em um evento curto no desenvolvimento ontogenético. A diferenciação do primórdio gonadal em um ovário ou testículo geralmente acontece durante o início do desenvolvimento ontogenético, porém há casos em que pode ocorrer ao longo de toda a vida, uma vez que pode ser influenciada tanto por fatores ambientais, quanto endócrinos ou por ploidia (PANDIAN, 2012). Assim, a diferenciação testicular ou ovariana é multifatorial e pode depender de vários fatores, bióticos ou abióticos. Em um primeiro momento, a determinação do sexo, pode ser desencadeado pela ação de algum gene mestre determinante do sexo, de vários loci

1 associados ao sexo, de um fator ambiental (por exemplo, temperatura, fotoperíodo) ou
 2 uma combinação deles, geralmente em gônadas sexualmente não diferenciadas. Durante
 3 os eventos subsequentes, pode haver ainda uma mudança do curso da diferenciação
 4 sexual, como a inversão do sexo, com fêmeas e machos genotípicos se desenvolvendo em
 5 machos e fêmeas fenotípicas, respectivamente (Figura 1) (MARTÍNEZ et al., 2014).
 6



7
 8 Figura 1 - Principais eventos que levam à diferenciação testicular e ovariana em peixes,
 9 de acordo com Martínez et al. (2014).

10 Na determinação sexual genotípica, os peixes possuem mecanismos variados,
 11 com machos heterogaméticos (machos XY, fêmeas XX); fêmeas heterogaméticas
 12 (fêmeas ZW, machos ZZ); sistemas com cromossomos sexuais múltiplos e loci gênico
 13 múltiplo; espécies sem cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados;
 14 hermafroditismo, fatores ambientais e epigenéticos, e fatores de interações sociais, que
 15 também podem influenciar na determinação do sexo (DE MITCHESON; LIU, 2008;
 16 GODWIN; LUCKENBACH; BORSKI, 2003; MANK; PROMISLOW; AVISE, 2006;
 17 VOLFF, 2002; WARNER; ROSS ROBERTSON; LEIGH, 1975).

18 Para os estudos relacionados nessa área, a busca e a identificação genética da
 19 determinação do sexo em peixes baseiam-se principalmente na homologia dos genes
 20 encontrados em outras espécies ou grupos, geralmente em mamíferos. Genes que são
 21 considerados chaves no processo de determinação em mamíferos, por exemplo, podem
 22 desempenhar apenas algum papel indireto na via de sinalização em peixes (PANDIAN,
 23 2012). Entre os genes já identificados em peixes, os principais podem ser funcionalmente
 24 classificados em grupos, segundo Forconi et al., (2013): i. genes necessários ao
 25 desenvolvimento da gônada bipotencial [tumor suppressor-1 de Wilm (WT1), fator
 26 esteroideogênico-1 (SF-1), e proteína 4 de ligação GATA (GATA-4)]; -ii. genes

1 envolvidos na determinação do sexo em machos [fator 1 de transcrição que se expressa
2 em gônadas indiferenciadas (DMRT1), box 9 relacionado ao SRY (SOX9), região crítica
3 no cromossomo X, dose-sensível na reversão sexual da hipoplasia adrenal (gene 1,
4 DAX1), fator 9 de crescimento do fibroblasto (FGF9), e “desert hedgehog” (DHH)]; iii.
5 genes envolvidos na diferenciação sexual do macho [AMH, AMHR2, e receptores de
6 andrógenos, (AR)]; –iv. genes envolvidos na determinação sexual da fêmea [sítio de
7 integração do membro 4 da família tipo Wingless MMTV (WNT4), Rspodin-1 (RSPO-
8 1), catenina β -1 (CTNNB1), fator de transcrição de forkhead box L2 (FOXL2), e
9 follistatin (FST)]; –v. genes envolvidos na diferenciação sexual da fêmea [aromatase,
10 conhecida como Cyp19A1 ou P450arom), receptor de estrógeno α (ER α), e receptor de
11 estrógeno β (ER β)].

12 Em relação aos estudos de expressão, vários genes já foram identificados e
13 funcionalmente descritos, como em zebrafish (*Danio rerio*), em que foi observado que o
14 gene *ffld*, homólogo ao *Sf-1* dos mamíferos, se expressa no hipotálamo e gônadas,
15 principalmente nas células de Sertoli e Leydig do testículo, e pode regular o *amh* (VON
16 HOFSTEN; LARSSON; OLSSON, 2005). Em medaka (*Oryzias latipes*), o gene mestre
17 da determinação do sexo é o *dmy*, cuja expressão ocorre nas células precursoras das
18 células de Sertoli (MATSUDA et al., 2002; RAYMOND et al., 1998); enquanto que em
19 *O. luzonensis*, o gene *gsdf*^v mostra-se como um dos principais na cascata de determinação
20 sexual, possuindo expressão altamente significativa nos machos durante a diferenciação
21 sexual (MYOSHO et al., 2012). Já em *O. dancena* foi demonstrado que o gene *sox3* inicia
22 a diferenciação testicular, pois ativa a cascata do gene *gsdf* (TAKEHANA et al., 2014).

23 Em peixe-rei (*Odontesthes hatcheri*), genes como o *dmrt1* e o *cyp19a1* exibem
24 expressão fortemente sexo-específica durante o período de diferenciação gonadal, o que
25 os tornam bons marcadores moleculares sexo-específicos (FERNANDINO et al., 2009).
26 Outros genes, como o *ndrg3* e o *pen-2* parecem estar associados à temperatura para
27 produção de machos, enquanto que o *hsp90* é altamente expresso nas células somáticas
28 das gônadas, na temperatura produtora de fêmeas (FERNANDINO et al., 2011). O gene
29 *amhy* foi descrito como um gene mestre na determinação sexual, durante a diferenciação
30 testicular em peixe-rei (HATTORI et al., 2013).

31 Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e em outros salmonídeos, o gene *sdv*
32 é expresso somente no testículo e possui expressão predominante na diferenciação
33 testicular, sendo um gene mestre na determinação do sexo (YANO et al., 2012, 2013).
34 Em baiacu (*Takifugu rubripes*), foi descrito que a determinação fenotípica do sexo é

1 determinada pelo gene *amhr2* (KAMIYA et al., 2012). Em *Astyanax altiparanae*, os
2 genes *drmt1* e *sox9* apresentam especificidade testicular, indicando funções macho-
3 específicas no animal adulto, provavelmente na manutenção da gônada (ADOLFI et al.,
4 2015).

5 Em geral, o fator de transcrição *dmrt1* tem sido demonstrado essencial na
6 gonadogênese e diferenciação testicular de todos grupos de peixes estudados,
7 gonocoristas e hermafroditas (HERPIN; SCHARTL, 2011), assim como o fator de
8 transcrição *foxl2* encontra-se associado à diferenciação e ao desenvolvimento ovariano
9 (SIEGFRIED, 2010). O gene *amh* tem-se demonstrado conservado entre os vertebrados,
10 o qual geralmente está correlacionado com a diferenciação testicular (HATTORI et al.,
11 2013; SIEGFRIED, 2010).

12 De maneira geral, os genes relacionados ao sexo em peixes constituem uma rica
13 fonte de estudos aplicados sobre determinação do sexo em vertebrados, especialmente
14 porque os peixes ocupam uma posição basal na filogenia destes animais. Os dados obtidos
15 com o grupo podem fornecer inferências que vão além dos detalhes específicos
16 encontrados dentro do táxon, como a plasticidade do processo de determinação sexual em
17 vertebrados e compreensão da determinação do sexo em geral (DEVLIN; NAGAHAMA,
18 2002). Além disso, esses estudos adicionam informações relacionadas às pressões
19 evolutivas que moldaram os diferentes caminhos da determinação sexual.

20 Apesar do crescente número de estudos evidenciando os principais genes
21 envolvidos na determinação e diferenciação sexual, o cenário encontrado para a
22 determinação do sexo em peixes ainda é incipiente. Somente 10% das espécies com
23 cariótipo conhecido possuem cromossomos sexuais (ARAI, 2011; DEVLIN;
24 NAGAHAMA, 2002) e 6% entre as espécies Neotropicais (OLIVEIRA; FORESTI;
25 HILSDORF, 2009). Inclusive nestes casos, não são reconhecidos genes determinantes do
26 sexo (SD), exceto para raros exemplos.

27 Dessa forma, entre as relevâncias de pesquisas nessa área, além de uma maior
28 compreensão dos caminhos evolutivos da determinação e diferenciação sexual em
29 vertebrados, os estudos das características biológicas reprodutivas relacionadas aos
30 peixes podem ter muitas aplicações, entre elas, para estratégias de conservação, na
31 compreensão dos efeitos das mudanças climáticas e de ações antrópicas entre elas, o
32 efeitos de poluentes, para aplicações biotecnológicas como a produção peixes
33 ginogênicos, poliploides, transgênicos, e para fins comerciais aplicáveis na piscicultura,
34 como o melhoramento genético e maior produtividade.

1
2 **1.2 O modelo evolutivo do complexo *Astyanax scabripinnis* – aspectos gerais,**
3 **sistemáticos e citogenéticos**

4 O gênero *Astyanax* corresponde a peixes conhecidos popularmente como piabas
5 ou lambaris, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (GERY, 1977). É um
6 dos grupos com maior número de espécies, com aproximadamente 255 espécies válidas
7 e distribuídas em praticamente todos os cursos de água da região Neotropical
8 (ESCHEMEYER, 2018). Sua sistemática ainda é mal definida dentre os integrantes da
9 família Characidae e o gênero não representa um táxon naturalmente monofilético,
10 usando caracteres morfológicos e dados moleculares (JAVONILLO et al., 2010;
11 MIRANDE, 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

12 O gênero *Astyanax* é bastante comum nos rios neotropicais (MOREIRA-FILHO;
13 BERTOLLO, 1991), com sua distribuição abrangendo a fronteira do México com os
14 Estados Unidos até o sul da Argentina (BRITSKI, 1972). De maneira geral, são peixes
15 pequenos, com linha lateral completa, discretamente curvada na região anterior;
16 nadadeira adiposa frequentemente presente; pré-maxilar não-protrátil; dentes pré-
17 maxilares arrançados em duas séries, sendo a interna com cinco dentes; dentes com
18 cúspides; altura do corpo aproximadamente três vezes o comprimento padrão e escamas
19 de tamanho normal. Devido à ocorrência de variações morfológicas e citogenéticas, três
20 “morfotipos” principais podem ser identificados em *Astyanax*, caracterizando complexos
21 de espécies: *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991); *A. altiparanae*
22 (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004) e *A. fasciatus* (ARTONI et al., 2006).

23 O complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* em geral possui cabeça robusta,
24 corpo também mais robusto na altura das nadadeiras peitorais e 25 ou menos raios na
25 nadadeira anal (ABILHOA, 2007).

26 O gênero *Astyanax* apresenta grande diversidade cromossômica, com cariótipos
27 morfológicamente indiferenciados entre os sexos e número diploide variando de 36 a 52
28 cromossomos (MORELLI et al., 1983; TENORIO et al., 2013). Entretanto, o número
29 diploide $2n=50$ cromossomos é o mais conservado e mais frequente entre as populações,
30 podendo ser considerado ancestral para o complexo *A. scabripinnis* (FERREIRA NETO
31 et al., 2009; KAVALCO et al., 2011).

32 Em *A. scabripinnis*, o número diploide varia de 46 a 50 cromossomos, com
33 padrões característicos de bandamento C, especialmente em grandes blocos nos braços
34 longos dos cromossomos subtelo- e acrocêntricos (MANTOVANI et al., 2000;

1 MOREIRA-FILHO; GALETTI; BERTOLLO, 2004; VICARI et al., 2008). Além do
2 complemento cariotípico padrão, é encontrada em várias populações a presença de
3 cromossomos supranumerários ou B, sendo *A. scabripinnis* considerada uma espécie
4 modelo para o estudo deste cromossomo quanto à sua origem, distribuição e
5 comportamento (revisado em Moreira-Filho; Galetti; Bertollo, 2004).

6 O complexo de espécies *A. scabripinnis*, em particular, inclui peixes pequenos,
7 que habitam riachos ou se encontram limitados às cabeceiras de pequenos tributários
8 (BRITSKI, 1972). Apresentam fecundação externa, ovulíparos com ausência de cuidado
9 parental ativo, não migradores ou migradores de pequenas distâncias e com dimorfismo
10 sexual na maior parte das populações, com machos apresentando espículas nas nadadeiras
11 pélvicas e anais (CASTRO et al., 2014b; NAVARRO et al., 2003; VAZZOLER;
12 MENEZES, 1992; VEREGUE; ORSI, 2003). Os peixes do gênero são considerados
13 gonocoristas, portanto a presença de gônadas sincrônicas intersexuais é considerado um
14 evento anormal (PRADO et al., 2011).

15 Considera-se que em *A. scabripinnis*, devido às condições de ajustes locais, em
16 conjunto com as características de comportamento reprodutivo, demonstrem tendência R
17 estrategista em relação ao ambiente em que vive (VEREGUE; ORSI, 2003). O período
18 reprodutivo desses animais é variado entre as populações, com reprodução descrita entre
19 o período de outubro a março (ABILHOA, 2007), abril a agosto (VEREGUE; ORSI,
20 2003) e atividade reprodutiva por todo o ano, em população de cativeiro (PEREIRA
21 FILHO et al., 2011). Entretanto, tipicamente a desova ocorre de maneira intermitente
22 mais comumente em períodos quentes e chuvosos em ambientes naturais (SALARO et
23 al., 2015).

24 Pouco se conhece a respeito da determinação genética do sexo nesses peixes, os
25 possíveis genes relacionados à determinação sexual e dados sobre os perfis da expressão
26 gênica. Assim, as características abordadas evidenciam esses peixes como um ótimo
27 modelo para este tipo de estudo, uma vez que, além do gênero *Astyanax* ser um dos mais
28 especiosos, a ordem Characiformes é um dos maiores grupos de peixes de água doce
29 (NELSON, 2006), sendo o modelo aplicável para outros characiformes. Além disso, as
30 informações obtidas possuem vários interesses, entre eles, na conservação e manutenção
31 desses peixes em meio natural e artificial, na aquicultura, como o controle na produção e
32 estabelecimento de populações estáveis, e para biotecnologia genética aplicada à
33 piscicultura.

34

1 **1.3 Cromossomos B e inferências populacionais em *A. scabripinnis*.**

2 Os cromossomos B são elementos genéticos supranumerários encontrados em
3 todos os grupos eucarióticos, que diferentemente dos cromossomos do complemento
4 padrão (cromossomos A), não pareiam com nenhum cromossomo A na meiose e exibem
5 formas irregulares de herança (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Pouco
6 se sabe sobre detalhes da composição gênica e a origem desses constituintes genômicos,
7 mas é suposto que na maioria dos casos, os cromossomos B sejam não funcionais e sem
8 genes essenciais, cuja presença não afeta o fenótipo do indivíduo portador (BURT;
9 TRIVERS, 2006; CAMACHO, 2005; JONES; REES, 1982). Nesse sentido, sua presença
10 ou ausência pouco interferiria nos aspectos biológicos. Contudo, com os avanços das
11 técnicas moleculares e estudos populacionais comparados, evidências funcionais desses
12 cromossomos têm sido descritas para vários organismos, com maiores detalhes sobre a
13 sua origem e evolução (BANAEI-MOGHADDAM et al., 2015).

14 Em alguns estudos com *A. scabripinnis*, inferências populacionais acerca da
15 ocorrência e frequência de cromossomos B mostraram que pode ocorrer variação de modo
16 sazonal entre os sexos. Maistro; Foresti; Oliveira (1994) evidenciaram uma prevalência
17 de cromossomos B no sexo feminino (23,5%) em uma população dessa espécie no
18 ribeirão Cascatinha (Botucatu, São Paulo, Brasil). Três anos após, a mesma população foi
19 reanalisada e mostrou cromossomos B em 36,9% das fêmeas (PORTO-FORESTI et al.,
20 1997). Da mesma maneira, Vicente; Moreira-Filho; Camacho (1996) também registraram
21 frequência mais significativa de cromossomos B em fêmeas em três populações
22 analisadas (Córrego das Pedras, Ribeirão do Casquilho e Ribeirão das Perdizes – Campos
23 do Jordão, São Paulo, Brasil), com 95,5%, 45,4% e 50% das fêmeas portando
24 cromossomo B, respectivamente. Os autores chamam a atenção para a distorção da razão
25 sexual em favor das fêmeas e a sua associação significativa com a frequência desses
26 cromossomos supranumerários, com um número altamente desproporcional de machos
27 sem esses cromossomos. A alta frequência de cromossomos Bs associados ao sexo
28 feminino também é relatada para outras espécies de *Astyanax*, como *A. paranae*. Silva et
29 al. (2014) em seu trabalho buscando delimitar a origem dos cromossomos B, apontou
30 presença em 36,9% das fêmeas e apenas 3,7% dos machos, corroborando a desproporção
31 observada em outras populações de *Astyanax* com ocorrência de cromossomos B. Essas
32 constatações sugerem que o cromossomo B possa estar de alguma maneira influenciando
33 na razão esperada 1:1 (FISHER, 1930) da proporção sexual. Alguns trabalhos em
34 artrópodes indicam que o cromossomo Y possa ser derivado de cromossomos B

1 (HACKSTEIN et al., 1996; NOKKALA et al., 2003) e em ciclídeos africanos foi
2 demonstrada a possível relação de cromossomos B específicos de fêmeas com a
3 determinação sexual (YOSHIDA et al., 2011).

4 Estudos recentes estão apontando maiores informações funcionais e detalhes da
5 composição do cromossomo B em *A. scabripinnis*. Já foi relatado que a ocorrência do
6 cromossomo B possivelmente está relacionado com as estratégias reprodutivas das
7 populações, especialmente no desenvolvimento dos estágios gonadais (CORNELIO et
8 al., 2017). O DNAr 18s e histona H1 está presente no cromossomo B de *A. paranae*
9 (SILVA et al., 2014) e DNAr 18s em *A. fasciatus* (FERREIRA-NETO et al., 2012).

10

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O contexto no qual as populações de *Astyanax scabripinnis* se apresenta torna o grupo propício para estudos evolutivos. Muitas questões sobre a determinação sexual em peixes e os principais genes envolvidos permanecem em aberto, especialmente em peixes neotropicais como *A. scabripinnis*.

Até o momento, nenhuma população/espécie do gênero *Astyanax* foi descrita com cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados com as técnicas usualmente empregadas. Também não há estudos que indiquem a presença de cromossomos provavelmente envolvidos com a determinação do sexo. Adicionalmente, a presença do cromossomo B e se este influencia no sexo permanece um campo a ser mais bem investigado, além do pouco que também se sabe sobre seu real papel funcional e composição gênica. Estudos recentes desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que os cromossomos B podem estar relacionados a possíveis estratégias reprodutivas de *A. scabripinnis*, especialmente em relação à contribuição energética e desenvolvimento dos estágios gonadais (CORNELIO et al., 2017).

A hipótese de que o cromossomo B possa estar distorcendo os perfis de expressão dos principais genes sexo determinantes não foi testada, apesar de estudos populacionais apontarem uma distorção da razão sexual em animais com a presença deste elemento supranumérico.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão dos principais genes candidatos à determinação sexual já descritos em outras espécies de peixes e inferir se estes podem estar sendo influenciados pela ocorrência de cromossomos B.

Objetivos específicos

- a) Caracterizar e sequenciar os principais genes candidatos a determinantes do sexo em *A. scabripinnis*;
- b) Investigar os níveis de expressão gênica em animais adultos machos e fêmeas com e sem cromossomo B;
- c) Contribuir para a elucidação da determinação do sexo nestes peixes e de possíveis relações com o cromossomo B.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras e locais de coleta

Os exemplares de *Astyanax scabripinnis* (Figura 2) foram provenientes de Guaratinguetá (Fazenda Lavrinha) - Estado de São Paulo (22° 40'49.5"S e 45° 23'31.9"W) (Figura 3). Um total de 120 indivíduos foi coletado, ativamente com peneiras de malha 0,5 mm entre nós e passivamente com armadilhas do tipo “covos”, em diferentes períodos do ciclo reprodutivo (meses de novembro a janeiro - período reprodutivo [60 indivíduos], e meses de abril a junho - período não reprodutivo [60 indivíduos]). Logo após a captura, os peixes foram acondicionados em sacos plásticos com água e oxigênio sob pressão, sendo conduzidos até a Estação Experimental de Salmonicultura (APTA/UDC – Campos do Jordão – São Paulo) para processamento. Todo o procedimento, desde a coleta, captura, manutenção e técnicas seguiram os padrões de ética em experimentação animal, com autorização legal fornecida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio – proc. 15115-1) e parecer de Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP-UEPG) (protocolo número 4509/08).

3.2 Histologia

Para todos os animais utilizados no estudo, foram retiradas cuidadosamente as gônadas para procedimentos histológicos, para confirmação sexual e classificação da maturação gonadal. As gônadas foram classificadas em dois grupos, de acordo com seu estágio macroscópico de maturação, segundo Vazzoler (1996): gônadas em maturação e gônadas maduras.

Para o procedimento histológico seguiu-se metodologia de acordo com CORNELIO et al., (2017), pequenos fragmentos das gônadas foram amostrados e dissecados com auxílio de uma tesoura e pinça, dentro de um tubo de 1,5 ml, e mantidos em 700 ul de solução Bouin por 24h em temperatura ambiente. Posteriormente, os tecidos foram desidratados e mantidos em etanol 70% até preparação para inclusão em parafina. O procedimento seguiu-se com desidratação progressiva em série alcoólica a 70%, 80%, 90% e 100% por uma hora cada e duas lavagens em xilol por 30 minutos cada. Em seguida, as peças foram embebidas em parafina e os blocos foram seccionadas em micrótomo, entre 3 a 5 µm de espessura. Os cortes foram contra corados com

1 hematoxilina e eosina e observados em microscopia de campo claro, sendo observado o
2 estágio de maturação dos ovários e dos testículos dos animais.

3 4 3.3 Extração de DNA

5 Pedacos de tecido muscular e fígado de todos os indivíduos coletados foram
6 preservados em álcool 80% para posterior extração de DNA. A extração de DNA foi
7 realizada com método de extração salina, de acordo com protocolo de Bruford et al.
8 (1992). Pequenos pedaços de tecido muscular (região da linha lateral) ou fígado foram
9 fragmentados com uma tesoura dentro de tubos de 1,5 ml. Em seguida, foi adicionado a
10 solução de lise aos tubos (410 µL de buffer de extração + 80 µL SDS 10% +15 µL
11 proteinase K 20 µ/µL + 2 µL Rnase). As amostras foram então incubadas a 55° até
12 completa digestão. Centrifugou-se o material a 13.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante
13 transferido para um tubo de 1,5 mL limpo. Foram acrescentados NaCL 5M e
14 homogeneizado até formação de um precipitado branco. Centrifugou-se novamente o
15 material a 13.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Foram acrescentados
16 1.000µL de isopropanol gelado (4°C) e centrifugou-se a 13.000 x g por 7 minutos. O
17 sobrenadante foi descartado. Acrescentou-se 250µL de etanol 80% e centrifugou-se a
18 13.000 x g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA secado banho maria a
19 50-55°C., sendo ressuspendido em TE ou água ultrapura.

20 21 3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA

22 Todos os animais utilizados foram mantidos nas mesmas condições ambientais.
23 Foi extraído RNA e sintetizado cDNA de todos os 120 indivíduos coletados. Após
24 eutanásia em benzocaína 1%, seguiu-se à dissecação para obtenção das preparações. As
25 gônadas foram imediatamente acondicionadas em RNAlater (Ambion) para preservação.
26 Posteriormente as amostras foram guardadas em freezer -80° C até o processamento. O
27 RNA total foi extraído através de homogeneização em TRIzol® (Invitrogen) de acordo
28 com protocolo do fabricante. 1000 µl de TRIzol foram adicionados em um tubo de 1,5 ml
29 juntamente com um fragmento da gônada. Incubou-se por 5 minutos e os tecidos
30 macerados até homogeneização. Em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio e
31 homogeneizado em misturador do tipo *vortex* por 30 segundos. Centrifugou-se a 12.000
32 x g por 15 minutos a 4° C, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se em seguida 500µl
33 de etanol 70% e centrifugou-se a 12.000 x g por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi

1 descartado e o RNA seco por 3 minutos em estufa a 37°C. O mesmo foi ressuspendido
2 em água DEPC e sua concentração medida em NanoVue (GE).

3 Após esse procedimento o RNA foi purificado adicionando-se 1µg em tubos de
4 500 µL. Adicionou-se 1 µl de 10x DNase I Reaction Buffer e 1 µl de DNase I Amp Grade
5 (Life). Completou-se com água DEPC até 10 µl. As amostras foram incubadas a 25° C por
6 15 minutos. Em seguida foi adicionado 1 µl de EDTA 25mM e aquecido a 65°C para
7 inativação da DNase.

8 A síntese de cDNA foi realizada adicionando-se ao RNA purificado o mix (1 µl
9 de oligo(dt) (Life) 10 mM+1 µl de DNTP mix (10mM)+2 µl de água DEPC). A mistura
10 foi aquecida a 65°C por 5 minutos e imediatamente resfriada em gelo por 1 minuto. Após,
11 adicionou-se o mix (4 µl de 5xFirst-Strand Buffer)+1 µl de 0.1 DTT+0,5 µl de RNase
12 OUT+ 0,5 µl de SSIII RT) (Life) e incubado a 50° C por 1 hora inativando-se a reação a
13 70°C por 15 minutos. O cDNA foi estocado a -20°C até o uso.

14

15 3.5 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

16 Para realização dos ensaios de qRT-PCR primeiramente foram elencados seis
17 genes (*amh*, *dmrt1*, *foxl2*, *gsdf*, *sox9* e *scp3*) reconhecidamente importantes no processo
18 de determinação e diferenciação sexual em peixes, para os quais foram desenhados
19 *primers* (Tabela 1) em regiões conservadas, obtidas a partir de várias sequências de
20 diferentes organismos, depositadas na base de dados *GenBank*
21 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e *Ensembl*
22 (<http://www.ensembl.org/index.html>). Para os genes *dmrt1*, e *sox9* foram utilizados
23 *primers* desenhados por Adolphi et al. (2015). Sequências genômicas de *A. mexicanus*
24 foram especialmente utilizadas como padrão comparativo.

25 Após padronização das reações em PCR comum com gDNA, os produtos foram
26 purificados utilizando o kit *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (GE Healthcare
27 Amersham Biosciences), conforme as especificações do fabricante. Seguiu-se o
28 sequenciamento no *ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer* (Perking-Elmer) usando o kit
29 *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), de acordo com
30 as instruções do fabricante. Excepcionalmente, os *primers* para os genes *gsdf*, *sox9* e *scp3*
31 não resultaram nos produtos esperados após sequenciamento, não sendo utilizados para
32 os experimentos subsequentes.

1 Após confirmação de sequência, foram desenhados primers específicos para
2 qRT-PCR dos genes confirmados (Tabela 2) em regiões de junção éxon-éxon das CDSs
3 (sequências codificantes). Todo o procedimento de alinhamento, construção de primers e
4 pesquisa no BLASTn foi realizado no suíte de ferramentas de biologia molecular e análise
5 NGS Geneious R11.

6 A qRT-PCR foi realizada no termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent
7 Technologies) usando SYBR Select Master Mix (Life), em um volume final de 12,7 µL,
8 com 2 µL de cDNA por reação e 0,4 µL de cada primer (10 mM). Os parâmetros dos
9 ciclos das reações foram: 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos a 95°C por 40
10 segundos e 60° C por 1 minuto. Após a amplificação, o passo de dissociação foi realizado
11 elevando a temperatura de 60°C a 95°C para criar a curva de melting e garantir a presença
12 de um único produto de amplificação. As curvas de diluição foram geradas por diluição
13 seriada (1:10) do cDNA usado para calcular as eficiências dos primers. Os dados de qPCR
14 foram obtidos pelo software MxPro (Agilent Technologies). As amostras sem valores de
15 Ct ou com Ct inconsistentes entre as réplicas foram removidas da análise (diferença de
16 Ct > 2 ciclos). Os dados foram normalizados contra os valores de β-actina e a
17 quantificação obtida por método de Ct comparativo através de curva padrão
18 (FERNANDINO et al., 2009; HATTORI et al., 2012). Os valores apresentados como
19 média ± desvio padrão da média (SEM) foram analisados por one way ANOVA, teste t
20 de Student e teste de Tukey p< 0.05, no software GraphPad Prism 7.

21 Os números de indivíduos analisados nos ensaios de q-RT-PCR estão
22 sumarizados na tabela 3.

23 24 3.6 Citogenética convencional

25 3.6.1 Preparação dos cromossomos mitóticos

26 Para todos os exemplares utilizados no estudo foram realizadas preparações
27 citogenéticas para confirmação de presença de cromossomo B.

28 A obtenção de material com células mitóticas foi realizada de acordo com
29 técnica descrita por BERTOLLO; CIOFFI; MOREIRA-FILHO (2015). As preparações
30 foram provenientes dos mesmos animais utilizados na extração de DNA e RNA.
31 Inicialmente foi injetada uma solução de Colchicina 0,025% (em proporção de 1 ml/100
32 g de peso do animal). Após transcorrido 60 minutos, os animais foram sacrificados,
33 prosseguindo pela retirada de porções do rim cefálico. Em seguida o material foi

1 transferido em cubas de vidro, com aproximadamente 10 ml de solução hipotônica (KCl
2 0,075 M). Com auxílio de uma seringa hipodérmica, o material foi cuidadosamente
3 fragmentado até obtenção de uma suspensão celular homogênea. Posteriormente esta
4 solução foi incubada a 37°C por 40 minutos. Após esse procedimento, foi acrescentado
5 1ml de fixador Carnoy metanol:ácido acético 3:1 e centrifugado por 10 minutos a 900
6 rpm. O sobrenadante foi retirado e então foi adicionado 6 ml de fixador, sendo novamente
7 centrifugado. O procedimento foi repetido por duas vezes. Após última centrifugação,
8 aproximadamente 1 ml de fixador foi adicionado, sendo a suspensão celular guardada em
9 freezer (-20°C). Também foi retirado um pequeno pedaço da nadadeira e colocada em
10 álcool etílico 70% para preservação. Posteriormente as nadadeiras foram maceradas em
11 ácido acético até a completa dissociação do tecido e posterior adição de fixador Carnoy
12 3:1.

13 Para preparação das lâminas, foram gotejadas cerca de 15 µl da suspensão
14 celular, com 30 µl de fixador Carnoy sobre o material em diferentes regiões de lâminas
15 aquecidas por volta de 50°C em placa aquecedora.

16

17 3.7 Citogenética molecular

18 3.7.1 Hibridação *in situ* Fluorescente

19 Para identificação da presença de cromossomo B nos animais em que não foram
20 obtidas metáfases, utilizou-se sonda de cromossomo B microdissectada, obtida de acordo
21 com os procedimentos descritos por Vicari et al. (2011) para posterior FISH nos núcleos
22 interfásicos obtidos a partir das nadadeiras, de acordo com procedimentos de Cornelio et
23 al. (2017). Para a construção da sonda de *dmrt1*, foram desenhados primers com base no
24 genoma de *A. mexicanus*, considerando-se a parte intrônica e exônica do gene, com
25 tamanho total de cerca de 24k pb. Para a amplificação, foram desenhados três sets de
26 primers, cada um com amplicom de aproximadamente 7,5k pb cada. Os primers foram
27 *dmrt1_f1*: 5' CCAGTGCCAGAAGTGCAAAC 3'; *dmrt1_r1*: 5'
28 AATGTGGGTCCATGGCTGAG 3'; *dmrt1_f2*: 5' CTCAGCCATGGACCCACATT 3';
29 *dmrt1_r2*: 5' CAGAGAGAACCTCCCTCGGA 3' e *dmrt1_f3*: 5'
30 TCTTTCACACTCGCAGGGTC 3'; *dmrt1_r3*: 5' AGGGTTGATGGACATGCAGG 3'.
31 Para a amplificação, os parâmetros da PCR foram: 100 ng de gDNA de *A. mexicanus*, 1x
32 DNA Polymerase buffer, 2 mM de MgCl₂, 400 µM de dNTP mix, 0.4 µM de cada primer,
33 e 2 U de Ex Taq DNA Polymerase (Takara). A programação dos ciclos foram: 94°C por

1 3 minutos seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C
2 por 8 minutos, com uma elongação final de 72°C por 10 minutos. Os produtos foram
3 clonados em plasmídeo bacteriano com kit vetor pGEM-T Easy (Promega) e
4 sequenciados no *ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer* (Perking-Elmer) usando o kit
5 *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), seguindo as
6 instruções do fabricante. Após a confirmação do inserto, foi realizada uma segunda PCR
7 nos produtos para marcar a sonda, nos mesmos parâmetros da primeira PCR exceto o uso
8 do dNTP digoxigenina 11 dUTP (Roche) no mix da PCR. As hibridações de *dmrt1* e
9 sonda B microdissectada foram realizadas em condições de alta estringência (2,5 ng/μL
10 sonda, 50% formamida, 2 X SSC, 10% sulfato dextrano), seguindo o procedimento geral
11 descrito por Pinkel; Straume; Gray (1986). Para a FISH de *dmrt1*, utilizou-se
12 adicionalmente bloqueador de repetitivos Cot1 na concentração 10x maior que da sonda.
13 A detecção do sinal foi realizada com o anticorpo Anti Digoxigenina Rodamina (Roche).
14 Os materiais foram contra corados com ProLong Gold Antifade with DAPI
15 (ThermoFisher). As preparações foram analisadas em microscópio de epifluorescência
16 Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de imagens DP 71 (Olympus). As
17 imagens foram capturadas com a utilização do sistema de captura de Imagens CCD
18 Olympus DP 71® e software DP-Controller versão 3.2.1.276.

19

20 3.8 Figuras e tabelas

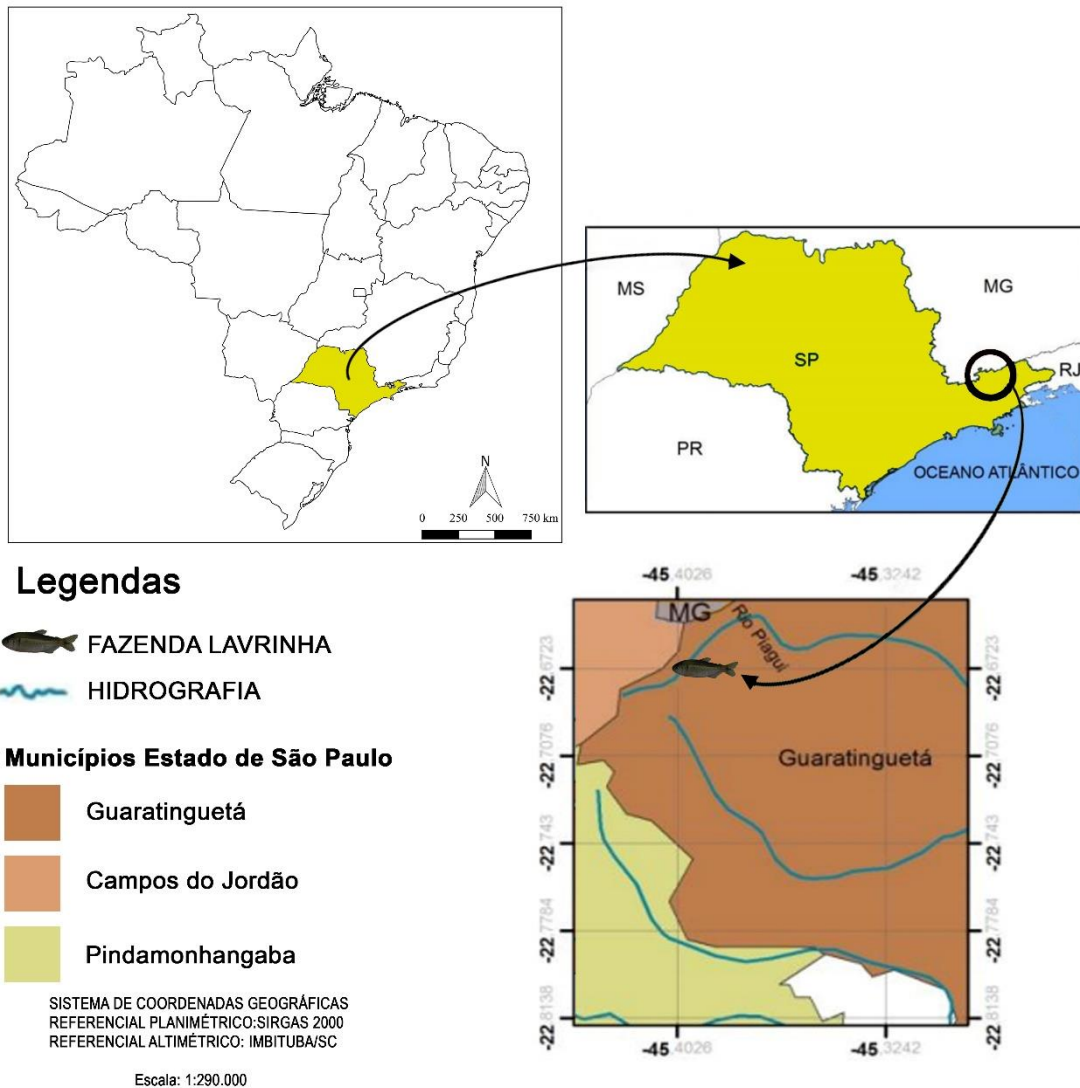
21



22

23 Figura 2 - Exemplo de *Astyanax scabripinnis*. Barra = 1 cm

24



1

2 Figura 3 - Mapa com a localização da região de coleta

3

4 Tabela 1 - Primers desenhados e utilizados em PCR convencional, para padronização e
5 confirmação de sequência.

Gene	Sequência do primer (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
Ame_amh_Fw1	CTGGGATGTTGAAGACGA	603 pb	Presente trabalho
Ame_amh_Rv1	GAGGAATTAATCAGCTCCAGAA		
Ame_amh_Fw2	ACTTGGAGTGTCATCGAG	558 pb	Presente trabalho
Ame_amh_Rv2	CTCTGGACGTGGCTGTT		
Ame_foxl2_Fw1	ACGTTCTTGGGCTCAGAGGA	459 pb	Presente trabalho

Ame_foxl2_Rv1	AGACTTGCCGGGTTGGAAGTG		
Ame_foxl2_Fw2	TCCCACCTCCAACCCGGCAAGT	459 pb	Presente trabalho
Ame_foxl2_Rv2	TTTGCCCTCGTGCTCCCAGTAAGG		
Ame_gsdF_Fw1	GTGTCCTCACATCACCTGGGTTT	631 pb	Presente trabalho
Ame_gsdF_Rv1	CGGTTTGGAAATGAACCTTCCACA		
Ame_gsdF_Fw2	CGGGAAGACCTTCGT	626 pb	Presente trabalho
Ame_gsdF_Rv2	TGTGTTGGGAAAGGG		
Dmrt1 I-F	TGCAGAAACCACGGCTTC	369 pb	(ADOLFI et al., 2015)
Dmrt1 I-R	GATGCCCATCTCCTCCTC		
Dmrt1 II-F	GGCAGTCCCTCCAGTTACAG	257 pb	(ADOLFI et al., 2015)
Dmrt1 II-R	GGGAGGGCTGGTAAAAGTTG		
Sox9 I-F	GAAGGACCATCCCGACTACA	1211 pb	(ADOLFI et al., 2015)
Sox9 I-R	GKGTRTACATKGGCCTCTGG		
Sox9 II-F	CGAACGTGTTCGGGAACCTTA	322 pb	(ADOLFI et al., 2015)
Sox9 II-R	GGCGTGGCTGTAGTAGGAGT		
Scp3_F	GACACCCGCTGAGAGAACTG	132 pb	
Scp3_R	GGTCAAGCAAAAGCACCTGG		

1

2 Tabela 2 – Primers utilizados na qRT-PCR

Gene	Sequência do primer (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
Amh_rtf1	CCTCACTGCTCTTCCTGACG	111 pb	Presente trabalho
Amh_rtr1	AAACACCCAACACAGCTTGC		
Dmrt1-RT-F	CAGCCTACTACAGCAACCTCTACAAT	76 pb	(ADOLFI et al., 2015)
Dmrt1-RT-R	TGGCTGGACAGACGGCTATC		
Foxl2_rtF1	ACCCTCAGCCAGATCTACCA	121 pb	Presente trabalho
Foxl2_rtR1	GCACCTTCTTGAAGCAGTCG		
βActin F_RT	ATCATGAAGTGCGACGTGGA	112 pb	Presente trabalho
βActin R_RT	TATTTACGCTCAGGTGGGGC		

3

4

5

1 Tabela 3 - Quantidade de exemplares utilizados na análise de expressão gênica

Gene	Gônadas em maturação					Gônadas maduras				Total	
	♀(B+)	♀(B-)	♂(B+)	♂(B-)	IS(♀) + (♂)	♀(B+)	♀(B-)	♂(B+)	♂(B-)		
<i>dmrt1</i>	9	4	4	6	1	1	4	3	6	7	44
<i>amh</i>	3	3	3	3	1	1	3	3	3	3	25
<i>foxl2</i>	4	4	4	4	1	1	6	4	4	6	37
Total											106

2

3

1 **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

2 Os resultados e discussão estão apresentados na forma de dois capítulos, os
3 quais se encontram elaborados no formato de artigos científicos:

4

5

CAPÍTULO 1

6

Differential expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) is
7 correlated with B chromosome occurrence (*Publicado na Zebrafish*)

8

CAPÍTULO 2

9

Expressão diferencial de genes relacionados à determinação sexual pode alterar o ciclo

10

reprodutivo de *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) em indivíduos

11

portadores de cromossomos B.

1 **CAPÍTULO 1 - Differential expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei,**
2 **Characidae) is correlated with B chromosome occurrence**

3
4 **Abstract**

5 *Astyanax* is an abundant fish genus in South America. Some species of this group
6 are characterized by the presence of B chromosomes and absence of morphologically
7 differentiated sex chromosomes. Here, we used qRT-PCR to characterize mRNA
8 expression of *dmrt1* in *A. scabripinnis* gonads. Maturing gonads of males with the B
9 chromosome overexpressed *dmrt1*. Our findings suggest that B chromosomes may have
10 an adaptive role in *A. scabripinnis* sex determination and maintenance.

11
12 **Keywords:** *dmrt1*, sex determination, sex differentiation, sex ratio, hermaphroditism, fish

13
14 **Introduction**

15 *Astyanax* Baird & Girard, 1854, is a genus of freshwater fish abundant in South
16 America. To date, their estimated diversity is nearly 200 species (ESCHEMEYER, 2018)
17 with a wide distribution along Neotropical continent (GERY, 1977). *Astyanax* contains
18 numerous cryptic species complexes, with *Astyanax scabripinnis* being among the most
19 representative (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991). This species complex has a
20 conspicuous karyotype characteristic, described in several allopatric populations: the
21 occurrence of B chromosomes (MOREIRA-FILHO; GALETTI; BERTOLLO, 2004). B
22 chromosomes are supernumerary genetic elements found in all eukaryotic groups, which
23 differ from standard complement chromosomes (A chromosomes), did not pair with any
24 A chromosome in meiosis and exhibit irregular forms of inheritance (CAMACHO;
25 SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Little is known about details of genomic
26 composition and the origin of these genomic elements, but it is a consensus that in most
27 cases, B chromosomes are considered non-functional and have no essential genes whose
28 presence does not affect the carrier's phenotype (BURT; TRIVERS, 2006; CAMACHO,
29 2005; JONES; REES, 1982). However, with the advancement of molecular techniques
30 and comparative population studies, functional evidence for this chromosome has been
31 described for various organisms in greater detail about their origin and evolution
32 (BANAEI-MOGHADDAM et al., 2015).

33 Sex ratio and B chromosome occurrence has been obtained for *A. scabripinnis*
34 populations and seasonality distortions was observed, with distortion of the sex ratio in

1 behalf of females and their significant association with the frequency of these B
2 chromosomes, with a highly disproportionate number of males without these
3 chromosomes (MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1994; PORTO-FORESTI et al.,
4 1997; SILVA et al., 2014; VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 1996).
5 Interestingly, although chromosomal variability is wide, no morphologically distinct sex
6 chromosomes have been detected in *A. scabripinnis* (PAZZA; KAVALCO, 2007).
7 Nevertheless, males during the reproductive season clearly possess secondary sexual
8 characters such as bony hooks on the anal fin (CASTRO et al., 2014b). Hermaphroditism
9 was recently recognized as typical for *A. scabripinnis*, although the genetic factors
10 involved in their primary sex determination and gonad differentiation remain unknown
11 (CORNELIO et al., 2017).

12 Primary sex determination in vertebrates involves both genetic and
13 environmental mechanisms, with temperature-dependent sex determination being a well-
14 known example of the latter (SUN et al., 2017). This complexity means that we still have
15 not fully resolved how sex is determined for the majority of fish species. For instance,
16 morphologically differentiated sex chromosomes are known for only 10% of species with
17 described karyotypes (ARAI, 2011; DEVLIN; NAGAHAMA, 2002) and for 6% of
18 Neotropical species (OLIVEIRA; FORESTI; HILSDORF, 2009). Even in these cases,
19 sex-determining (SD) genes generally remain unknown, with a few exceptions, such as
20 *amhy* in *Odontesthes bonariensis* (HATTORI et al., 2013).

21 Multiple genes have been implicated in the regulation of sex determination
22 cascade (MARTÍNEZ et al., 2014). Some of these are related to mutations in the DM
23 (Doublesex Male) domain, such as *dmy/dmrt1Y*, specific to medaka (*Oryzias latipes*)
24 (MATSUDA et al., 2002; NANDA et al., 2002). First described in *Drosophila*
25 *melanogaster* as doublesex (ERDMAN; BURTIS, 1993) and in *Caenorhabditis elegans* as
26 *mab-3* (RAYMOND et al., 1998), *dmrt1* encodes a transcription factor with a highly
27 conserved zinc-finger motif. The gene is masculinizing, responsible for male gonadal
28 development in metazoans and, depending on species, acts either as an upstream or
29 downstream regulator in the sex differentiation cascade (HODGKIN, 2002; ZHU et al.,
30 2000).

31 In vertebrates, *dmrt1/DMRT1* (Doublesex Maleabnormal-3 Related
32 Transcription Factor-1) encodes a transcription factor with a highly conserved DNA-
33 binding motif (i.e., DM domain). The gene is critical to primary sex determination and
34 testicular differentiation for many species (MATSON; ZARKOWER, 2012). Expression

1 of *dmrt1* is dimorphic, but a transcription imbalance can occasionally cause male-to-
2 female sex reversal, as seen in some amphibians (SHIBATA; TAKASE; NAKAMURA,
3 2002), chicken (SMITH et al., 2009), and fish (MASUYAMA et al., 2012). For instance,
4 in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), *dmrt1* likely appeared around
5 30 mya and in parallel to the differentiation of a ZZ-ZW chromosomal SD system. During
6 *C. semilaevis* development, both sexes exhibit sex-specific differential *dmrt1* expression
7 that apparently occurs through a dosage compensation mechanism (CHEN et al., 2014).

8 To clarify the role of *dmrt1* in *A. scabripinnis* sex determination and determine
9 potential links to the species' unique B chromosome, here we characterize the gene's
10 expression among individuals with or without B.

11 **Materials and Methods**

12 ***Sampling site and specimens***

13 Fifty-one *A. scabripinnis* specimens (25 males, 25 females, and 1
14 hermaphrodite) were collected from the Lavrinha Stream (S 22°43'09.6", W 45°25'38.5")
15 in Guaratinguetá, Brazil. The mature specimens were collected in reproductive
16 (November to January) season and the maturing, in non-reproductive (April to June)
17 season.. Specimens were anesthetized with 0.1% benzocaine and sacrificed. All
18 procedures followed ethical guidelines for animal experimentation detailed by the
19 *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio-proc 15115) and
20 *Comissão de Ética em Experimentação Animal* (COEP-UEPG).

21 ***Histology***

22 Gonads were dissected and fixed in Bouin solution for 24 h at room temperature
23 (25° C). Fixed tissues were dehydrated, embedded in paraffin, sectioned (3–5 µm
24 thickness), then counterstained with hematoxylin and eosin for sex identification. Gonads
25 were classified as either maturing or mature according to (VAZZOLER, 1996).

26 ***Whole chromosome painting (WCP) and fluorescence in situ hybridization (FISH)***

27 To detect B chromosome presence through WCP, mitotic chromosomes were
28 obtained following a published protocol (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-
29 FILHO, 1978). Additionally, a 5 mm³ fin sample was preserved in 70% ethyl alcohol,
30 then fully dissolved in acetic acid. Subsequently, a 3:1 Carnoy's solution was added to
31 the fin sample. A microdissected B-chromosome probe was then amplified through DOP-
32
33
34

1 PCR following previous methods (VICARI et al., 2011). Subsequent WCP of interphase
2 nuclei obtained from fins was also performed according to published
3 procedure(CORNELIO et al., 2017). Hybridization occurred under high-stringency
4 conditions (2.5 ng/μL probe, 50% formamide, 2× SSC, 10% dextran sulfate), following a
5 general protocol(PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986). Signals were detected with the
6 Anti-Digoxigenin-Rhodamine antibody (Roche, Germany, Mannheim). Materials were
7 counterstained with ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (ThermoFisher,
8 Canada, Burlington). Preparations were analyzed using an epifluorescence microscope
9 (Olympus BX41, USA, New York) coupled to an image capture system (CCD Olympus
10 DP 71® and DP-Controller v. 3.2.1.276).

11

12 ***RNA extraction and cDNA synthesis***

13 After dissection, 3 mm³ gonad samples were immediately placed in RNAlater
14 (Ambion, Lithuania, Vilnius) for 24 h and stored at -80°C to preserve nucleic acids. Total
15 RNA was extracted through homogenization in TRIzol (Invitrogen, Canada, Burlington)
16 following manufacturer protocol, then purified with recombinant DNaseI (Invitrogen,
17 Canada, Burlington) and quantified via spectrophotometry. Quality was verified through
18 visualization of 28S and 18S bands in 1% agarose gels. Next, cDNA synthesis was
19 performed with 1 μg of total RNA, oligo-dT₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen, Canada,
20 Burlington), and reverse transcriptase Super Script III (Invitrogen, Canada, Burlington).
21 The product was then diluted at 1:3 in nuclease-free water.

22

23 ***Real-time quantitative PCR (qRT-PCR)***

24 The experiment analyzed 44 individuals split into five experimental groups per
25 gonad classification: female with B, female without B, male with B, male without B,
26 hermaphrodite. The maturing gonad category included nine, four, four, six, and one
27 individual per group, respectively. The mature gonad category included four, three, six,
28 seven, and 0 individuals per group. Each sample was run in triplicate to correct inter-
29 assay variation.

30 Real-time quantitative PCR was performed in the thermocycler Stratagene
31 Mx3005P (Agilent Technologies, Germany, Waldbronn). Reaction volume was 12.7 μL,
32 including 9.9 μL SYBR Select Master Mix (Life), 2 μL of cDNA, and 0.4 μL of each
33 primer (10 mM). Primer3 (KORESSAAR; REMM, 2007; UNTERGASSER et al., 2012)
34 was used to design specific primers for *dmrt1* from existing sequences (ADOLFI et al.,

1 2015) and for reference gene *β-actin* from genomic sequences of *Astyanax mexicanus* in
2 Ensembl (AKEN et al., 2016). All sequences amplified with the primers were confirmed
3 by sequencing. The primers cover different exons to avoid amplification with
4 contaminant gDNA. Thermocycling conditions were: 95°C for 10 min, followed by 40
5 cycles of 95°C for 30 seconds and 60°C for 1 min, and then ending with a temperature
6 increase from 60°C to 95°C. The final step created a melting curve and guaranteed unique
7 amplicons. Dilution curves for calculating primer efficiency were generated through
8 serial dilution (1:10) of cDNA.

9 Samples were excluded if they were without Ct values or had inconsistent Ct
10 between replicates (Ct difference > 2 cycles). Analysis and quantification using the
11 standard curve method were carried out with the MxPro software (Agilent Technologies,
12 Germany, Waldbronn). Expression values for *dmrt1* bY and *dmrt1* a were normalized
13 using *β-actin* as reference gene control. Means ± SEM data were analyzed with one-way
14 ANOVA followed by Tukey's test in GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA,
15 California). Significance was set at $p < 0.05$.

16

17 **Results**

18

19 ***Histology identification***

20 Histological analyses of gonadal cross-sections confirmed sex identification
21 (Figure 1a, b) and morphology according (CORNELIO et al., 2017) . A hermaphrodite-
22 like individual was also identified with maturing gonads (Figure 1c, d).

23

24 ***Detection of B chromosome through WCP and FISH***

25 The entire B chromosome was successfully visualized using WCP (Figure 2).
26 Signals in interphase nuclei were also detected in B+ bearing individuals. These results
27 were used to verify B chromosome presence in all samples, as previously recommended
28 (CORNELIO et al., 2017).

29

30 ***Sex, B chromosome, and gonad maturity influence *dmrt1* expression***

31 Both sex and B chromosome presence significantly affected *dmrt1* mRNA
32 expression. Additionally, gonad maturation stage influenced mRNA expression.
33 Maturing male gonads with B chromosome exhibited significantly higher relative

1 expression than others groups (Figure 1 e, f; Table 1). The single hermaphrodite-like
2 individual (with B chromosome) showed synchronized maturation of both female and
3 male parts, apparently showing greater *dmrt1* expression in the latter. The statistics
4 showed no significant differences between the hermaphroditic parts, perhaps because of
5 the low sample size. (Figure 1). Supplementary Material 1 provides additional statistics.

6

7 **Discussion**

8 This study is the first to observe that *dmrt1* expression levels are highly
9 associated with male sex, gonadal maturation stage, and B chromosome presence in *A.*
10 *scabripinnis*. The *dmrt1* gene is involved in sex determination and gonadal development
11 in numerous vertebrates (MATSON; ZARKOWER, 2012). Evidence from fish
12 (*Odontesthes bonariensis*: (FERNANDINO; GUILGUR; SOMOZA, 2006)
13 *Halobatrachus didactylus*: (UBEDA-MANZANARO et al., 2014)) suggests that *dmrt1*
14 also affects spermatogenesis onset and maintenance. In teleosts, *dmrt1* is expressed
15 during male gonad differentiation (ADOLFI et al., 2015; FERNANDINO et al., 2009;
16 FERNANDINO; GUILGUR; SOMOZA, 2006; HERPIN; SCHARTL, 2011;
17 MASUYAMA et al., 2012; NANDA et al., 2002). A functional copy specific to the Y
18 chromosome (*dmrt1Y*) and one autosomal copy (*dmrt1*) has been reported in *Oryzias*
19 *latipes* (XX/XY sex system) (MATSUDA et al., 2002; NANDA et al., 2002). In
20 *Cynoglossus semilaevis*, *dmrt1* is localized to the Z but not in the W chromosome. Thus,
21 genetic males (ZZ) have two copies of *dmrt1*, whereas genetic females (ZW) have only
22 one (CHEN et al., 2014; CUI et al., 2017). In fish, the chromosomal location of co-opted
23 copies of *dmrt1* is quite complex.

24 Male gonads of B+ bearing *A. scabripinnis* overexpressed *dmrt1*, suggesting a
25 surprising adaptive role for the unique chromosome. Relatedly, B+ bearing *A.*
26 *scabripinnis* females have a different reproductive activity peak, occurred during the
27 summer (December), while B lacking females, an reproductive peak extending from July
28 to December (CORNELIO et al., 2017). Together, these observations imply a
29 reproductive advantage for B+ bearing fish.

30 In zebrafish was demonstrated that adult testis had *dmrt1* expression in nearly
31 all stages of spermatogenesis, whereas majority of *dmrt1* mutant develop as fertile
32 females (WEBSTER et al., 2017) Likewise, this condition is observed in mammals, which
33 *dmrt1* plays a crucial role in differentiating spermatogonia. The deletion of *dmrt1* in
34 spermatogonial stem cells have a progressive failure of spermatogenesis. These

1 inferences show correlation between *dmrt1* and longer period of
2 spermatogenesis(ZHANG; ZARKOWER, 2017).

3 Thereby, B+ bearing males can have extended spermatogenesis that allows them
4 to reproduce with similarly B+ bearing females outside the typical reproductive period
5 for this species(CORNELIO et al., 2017). This increases the adaptive value and hence
6 maintenance of the B chromosome in the population. A factor regulating *dmrt1*
7 expression may be present on the B chromosome of *A. scabripinnis*

8 This inference led us to perform chromosome mapping analysis using *dmrt1*
9 gene sequence as probe in FISH (data not show). We found signals in interstitial,
10 equilocal regions of the B chromosome's short and long arms. This pattern is similar to
11 the localization of *As51*, a repetitive DNA fragment (MESTRINER et al., 2000) that is
12 associated with transposon elements and microsatellites (BARBOSA et al., 2015, 2017).
13 However, we note that the likelihood of false localization on the B chromosome is high,
14 because the used probe contains large intronic segments of *dmrt1* (a mix of the cloned
15 introns and exons) that increases signal detection during optical microscopy, resulting in
16 the potential marking of other homologous regions.

17 We recently described hermaphroditism in *A. scabripinnis* (CORNELIO et al.,
18 2017), a phenomenon apparently linked to fish populations inhabiting small, high-altitude
19 rivers with unstable temperatures and seasonal flooding. This observation is in keeping
20 with the idea that environmental disruption, along with biological factors, trigger
21 hermaphroditism in fish (DE MITCHESON; LIU, 2008). Our current results indicate that
22 to understand hermaphroditism, future studies should pay particular attention to *dmrt1*
23 expression during initial stages of *A. scabripinnis* ontogeny. Suggestively, *dmrt1*
24 regulation in *A. scabripinnis* influences both hermaphrodite occurrence and sex ratios;
25 the latter tends to be unbalanced and has been linked to B chromosome presence
26 (VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 1996). Reflecting the importance of
27 *dmrt1* in testicular differentiation, a mutation in the gene caused ovaries to develop in XY
28 *Oryzias latipes* (MASUYAMA et al., 2012). In contrast, *dmrt1* mutation in *Cynoglossus*
29 *semilaevis* disrupted both spermatogenesis and ovarian development (CUI et al., 2017).
30 These data support our previous observations of *A. scabripinnis* hermaphrodites and
31 confirms the importance of *dmrt1* in the species' sex differentiation and maintenance.

32 Balanced sex ratios (1:1) is an adaptive condition (HAMILTON, 1967) ensured
33 by heterogametes in organisms with morphologically differentiated sex chromosomes.
34 However, this condition has not been found for the majority of teleosts, including *A.*

1 *scabripinnis*. In fact, such sex chromosomes occur in only around 6% of fish species
2 (OLIVEIRA; FORESTI; HILSDORF, 2009; PENMAN; PIFERRER, 2008). For most
3 fish, sex determination and sex ratios are exclusively due to the expression of correlated
4 genes following an unresolved, complex cascade that is heavily influenced by
5 environmental factors (MARTÍNEZ et al., 2014). A strong environmental influence is not
6 unique to fish and has also been reported in other taxa, including reptiles, where egg
7 incubation temperature determines sex (JANES et al., 2014). In amphibians,
8 environmental factors also have a huge impact on sex determination, and sex can be
9 converted through steroid action, as seen in *Rana rugosa* (NAKAMURA, 2009). Also
10 among homoeothermic vertebrates, the epigenetic influence of temperature on sex
11 determination is observed. Among the ZZ/ZW sex chromosome system of birds, *dmrt1*
12 overexpression in embryos induces the development of male gonads (LAMBETH et al.,
13 2014). Currently, much remains to be understood regarding epigenetic effects affecting
14 vertebrate sex determination and differentiation. Genes such as *dmrt1* are strong
15 candidates for deeper investigation into this topic.

16 To conclude, our findings support a possible adaptive role for B chromosome
17 presence in *A. scabripinnis*. Furthermore, this study highlights the importance of *dmrt1*
18 on sex determination and maintenance.

19

20 **Acknowledgments**

21 The authors are grateful to the *Instituto Chico Mendes de Conservação da*
22 *Biodiversidade* (ICMBio). This work was supported by the *Conselho Nacional de*
23 *Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, process number 407187/2016-2),
24 *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, scholarship to
25 JPC, finance code 001) and the *Fundação Araucária* (Fundação Araucária de Apoio ao
26 Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, grant number 16174).

27

28 **Referências Bibliográficas**

29 As referências bibliográficas deste Capítulo encontram-se reunidas ao final desta tese.

30

31 **Figures and Tables**

32

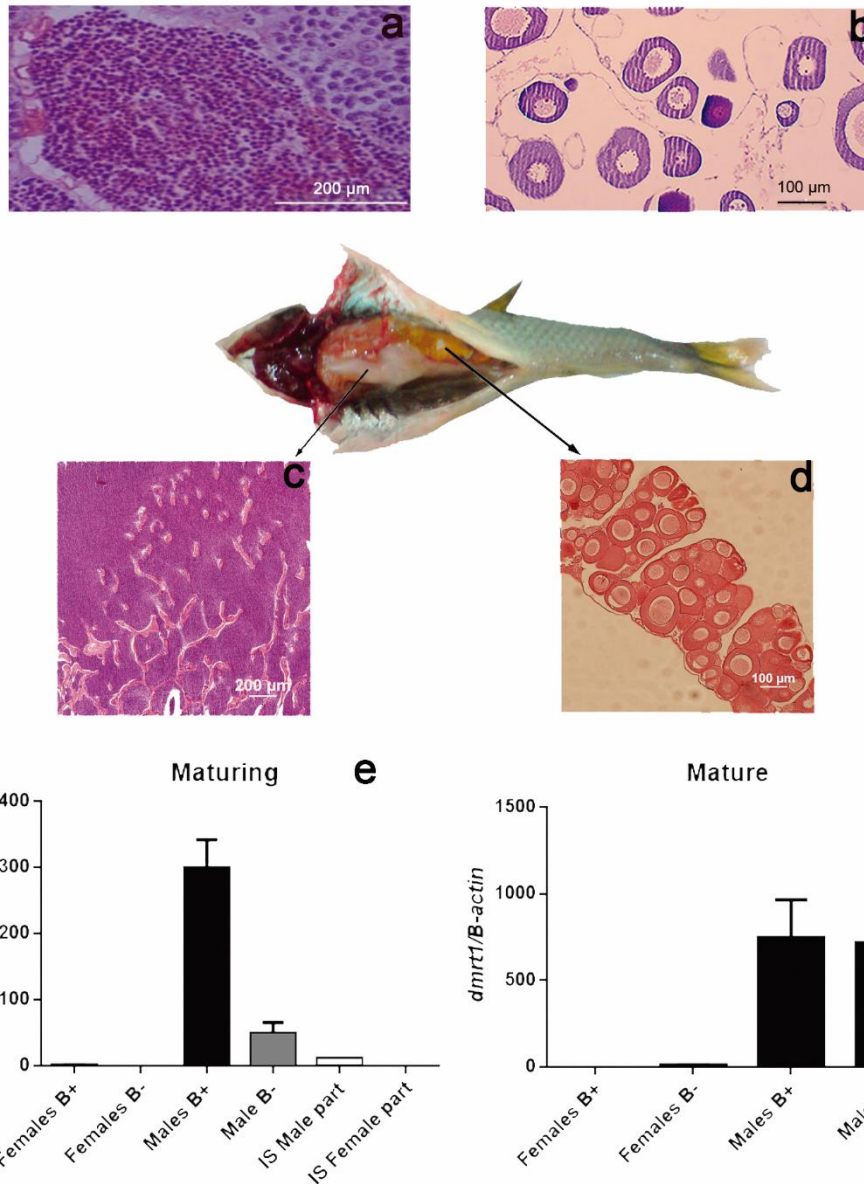
33

1 Table 1- Statistical analysis (ANOVA with Tukey's tests) of dmrt1 expression in female,
 2 male, and hermaphrodite gonads of *Astyanax scabripinnis* with or without B chromosome.

Tukey's multiple comparisons	Mean difference	95% CI	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Females B+ vs. Males B+	-297.4	-381.1 to -213.7	Yes	****	<0.0001
Females B+ vs. Male B-	-47.75	-118.8 to 23.28	No	ns	0.2644
Females B+ vs. IS Male part	-9.265	-138.9 to 120.4	No	ns	0.9993
Females B+ vs. IS Female part	0.8912	-128.8 to 130.6	No	ns	>0.9999
Males B+ vs. Male B-	249.7	161.1 to 338.3	Yes	****	<0.0001
Males B+ vs. IS Male part	288.2	148.1 to 428.2	Yes	***	0.0002
Males B+ vs. IS Female part	298.3	158.3 to 438.4	Yes	***	0.0002
Male B- vs. IS Male part	38.48	-94.4 to 171.4	No	ns	0.8826
Male B- vs. IS Female part	48.64	-84.24 to 181.5	No	ns	0.7693
IS Male part vs. IS Female part	10.16	-161.4 to 181.7	No	ns	0.9997
Females B+ vs. Females B-	-7.973	-360.9 to 344.9	No	ns	0.9999
Females B+ vs. Males B+	-744.6	-1145 to -344.5	Yes	**	0.0015
Females B+ vs. Male B-	-718.5	-1071 to -365.6	Yes	***	0.0008
Females B- vs. Males B+	-736.7	-1158 to -314.9	Yes	**	0.0023
Females B- vs. Male B-	-710.5	-1088 to -333.3	Yes	**	0.0014
Males B+ vs. Male B-	26.13	-395.7 to 447.9	No	ns	0.9970

3 **Groups:** — Maturing gonads — Mature gonads B+, individual with B chromosome; B-,
 4 individual lacking B chromosome; IS, intersex; ns, not significant, **** P < 0.0001, extremely
 5 significant; *** P 0.0001 to 0.001, extremely significant; ** P 0.001 to 0.01, very significant.

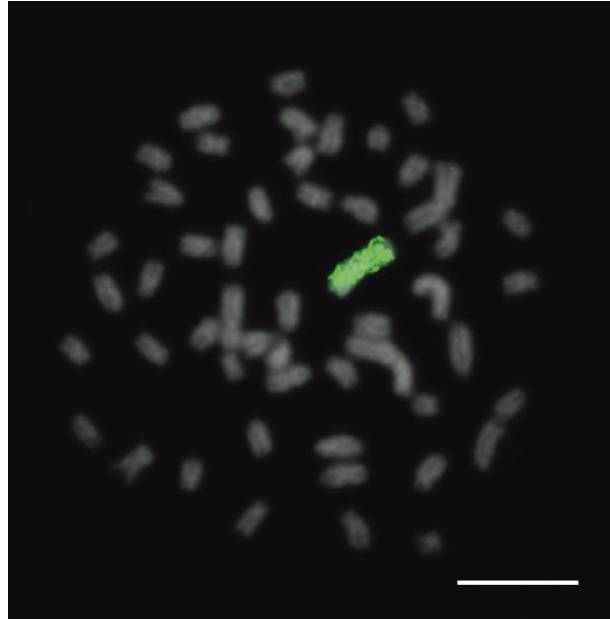
6



1

2 Figure 1. Histological sections of *Astyanax scabripinnis* gonads. (a) male, (b) female, (c)
 3 hermaphrodite male gonad part, (d) hermaphrodite female gonad part Graphs (e) and (f)
 4 highlight between-group differences in *dmrt1* expression, based on qRT-PCR analysis.

5



1
2
3
4

Figure 2. Whole chromosome painting with microdissected B-chromosome probe. Bar: 10 μm .

1 **CAPÍTULO 2 - Expressão diferencial de genes relacionados à determinação sexual**
2 **pode alterar o ciclo reprodutivo de *Astyanax scabripinnis* (Characiformes:**
3 **Characidae) em indivíduos portadores de cromossomos B.**

4
5 **Resumo**

6 O complexo de espécies *Astyanax. scabripinnis* é um dos mais estudados quanto
7 à origem, distribuição e frequência de cromossomos B, sendo considerado um organismo
8 modelo para estudos evolutivos. Vários estudos com inferências populacionais acerca da
9 ocorrência e frequência de cromossomos B mostram haver variação sazonal entre os
10 sexos, associados com a presença deste elemento supranumérico. A hipótese é de que o
11 cromossomo B possa influenciar na razão sexual destes animais. A partir desta
12 constatação, o presente trabalho objetivou inferir se há diferenças entre os níveis de
13 expressão gênica dos genes *amh* (associado à diferenciação testicular) e *foxl2* (associado
14 à diferenciação ovariana) entre animais portadores e não portadores de cromossomos B.
15 Os resultados obtidos mostraram que para o gene *amh* a diferença de expressão entre
16 animais com cromossomos B não foi muito acentuada entre os animais ausentes deste
17 cromossomo. Entretanto, a expressão do gene *foxl2* foi atípica para as fêmeas portadoras
18 de cromossomos B, mostrando uma redução da expressão deste gene. Tal redução é
19 similar ao encontrado nos machos, independentemente da presença de cromossomo B. As
20 gônadas masculinas foram, de certa forma, mais conservadoras em relação a expressão
21 dos genes *amh* e *foxl2*, independente do estágio de maturação e da ocorrência de
22 cromossomo B. Esses resultados indicam que a presença de cromossomos B se encontra
23 correlacionada com a expressão diferencial de genes relacionados ao sexo, alterando o
24 ciclo reprodutivo dos indivíduos portadores desses cromossomos.

25
26 **Introdução**

27 Um dos aspectos mais interessantes e fundamentais da história da vida são os
28 processos que moldaram a evolução sexual e seus diversos processos de determinação. O
29 desenvolvimento sexual e seus estágios já se encontram descritos para diferentes grupos
30 de vertebrados, o que permitiu o estabelecimento de dois mecanismos gerais de
31 determinação do sexo: a determinação genética (GSD) e a determinação externa (ESD)
32 (TRUKHINA et al., 2013).

1 Especialmente entre os peixes, esses processos exibem um padrão complexo de variáveis,
2 tanto na determinação como no controle da diferenciação sexual (DEVLIN;
3 NAGAHAMA, 2002). Nesses organismos, o primeiro mecanismo de determinação do
4 sexo pode ser desencadeado pela ação de algum gene principal, ou por vários loci
5 associados ao sexo, ou ainda por influência de um fator ambiental (por exemplo,
6 temperatura) ou uma combinação deles, geralmente em gônadas sexualmente não
7 diferenciadas. Entretanto, nos eventos subsequentes, pode haver uma mudança do curso
8 da diferenciação sexual, a exemplo da inversão do sexo, onde fêmeas e machos
9 genotípicos se desenvolvem como machos e fêmeas fenotípicas, respectivamente
10 (MARTÍNEZ et al., 2014).

11 Por ora, o conhecimento da determinação do sexo nos peixes encontra-se
12 principalmente associado à homologia com genes relacionados a esse processo,
13 encontrados em outras espécies ou grupos mais distantes. Contudo, genes que são
14 considerados fundamentais no processo de determinação sexual em mamíferos, por
15 exemplo, podem desempenhar apenas algum papel indireto na via de sinalização em
16 peixes (PANDIAN, 2012). Alguns genes têm sido descritos como chaves na
17 determinação e diferenciação do sexo em vertebrados. O gene AMH (Anti-Mullerian
18 Hormone), por exemplo, um membro da superfamília TGF- β , é reportado como
19 responsável pela regressão dos dutos de Müller durante o desenvolvimento fetal
20 masculino em répteis, aves e mamíferos (JOSSO; DI CLEMENTE; GOUÉDARD, 2001;
21 REY et al., 2003). Este gene apresenta um mecanismo de ação conservado entre os
22 vertebrados e seu homólogo *amh* geralmente é expresso nas células de Sertoli em peixes,
23 tendo participação na diferenciação testicular. Sua expressão foi reportada para 21
24 espécies deste grupo e seus transcritos relatados principalmente em testículos de
25 indivíduos adultos (revisto em PFENNIG et al., 2015). Em *Oreochromis niloticus*, a
26 expressão de *amh* é detectada em baixos níveis nas gônadas antes da diferenciação sexual,
27 tanto em animais XX quanto XY e se apresenta dimórfica nos machos após o início da
28 diferenciação da linhagem germinativa (SIEGFRIED, 2010). Igualmente em *Danio rerio*,
29 sua expressão dimórfica nas gônadas também está correlacionada com o início da
30 diferenciação sexual, estando porém restrita ao desenvolvimento dos testículos
31 (RODRÍGUEZ-MARÍ et al., 2005; WANG; ORBAN, 2007). Em *Odontesthes hatcheri*,
32 uma cópia duplicada do gene *amh* ligada ao cromossomo Y (*amhy*), foi descrita como
33 gene mestre sexo determinante em machos (HATTORI et al., 2012).

1 Outro gene de ação conservada na cascata de genes envolvidos na determinação
2 e diferenciação sexual entre os vertebrados é o fator de transcrição *Forkhead Box Like-2*
3 - *foxl2*, que se encontra associado à diferenciação e ao desenvolvimento ovariano
4 (SIEGFRIED, 2010), mostrando uma clara expressão dimórfica sexual em muitos peixes
5 teleósteos adultos (eels, arowanas, herrings, carps, zebrafish, catfishes, e cavefish), com
6 maior expressão nos ovários em comparação aos testículos (BERTHO et al., 2016).
7 Ainda que os estudos relacionados aos genes e seu papel na determinação e diferenciação
8 sexual em peixes esteja em ascensão, o cenário para as espécies neotropicais ainda é uma
9 questão em aberto. Apenas cerca de 6%, das mais de 5 mil espécies de peixes neotropicais
10 conhecidas (REIS et al., 2016), possuem cromossomos sexuais morfologicamente
11 diferenciados (OLIVEIRA; FORESTI; HILSDORF, 2009) e, mesmo considerando estas
12 evidências, não foram ainda relatados genes determinantes do sexo (SD) para estes
13 peixes.

14 Os peixes do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 constituem um dos grupos
15 de água doce dominantes na América do Sul. A sua diversidade se aproxima de 250
16 espécies conhecidas (ESCHEMEYER, 2018), com distribuição ampla por toda a América
17 (GERY, 1977). Contudo, apesar de apresentarem uma alta diversidade cariotípica, não
18 foram identificados, até o momento, diferenciações cariotípicas associadas ao sexo em
19 nenhuma das espécies deste gênero (TENORIO et al., 2013).

20 Em *Astyanax*, são reconhecidos complexos de espécies crípticas, dentre os quais,
21 se destaca o complexo *Astyanax scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991).
22 Uma característica citogenética marcante neste complexo é a ocorrência de cromossomos
23 B equivalentes em tamanho ao primeiro par do complemento cariotípico, em diferentes
24 populações alopátricas (MOREIRA-FILHO; GALETTI; BERTOLLO, 2004).

25 Os cromossomos B são elementos genéticos adicionais encontrados em todos os
26 grupos eucarióticos, os quais não se pareiam na meiose com cromossomos do
27 complemento padrão (cromossomos A). Estes cromossomos adicionais podem exibir
28 segregação irregular na meiose, com taxas de transmissão maiores que 0,5, não
29 obedecendo assim os princípios mendelianos, com mecanismos de acúmulo populacional
30 (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Até pouco tempo atrás, acreditava-se
31 que os cromossomos B não portavam genes funcionais e não eram capazes de alterar o
32 fenótipo dos organismos portadores (BURT; TRIVERS, 2006; CAMACHO, 2005;
33 JONES; REES, 1982). Todavia, estudos recentes têm verificado a ocorrência de genes
34 relacionados a divisão celular, ao ciclo mitótico, ao metabolismo celular e a transcrição

1 nucleotídica nestes cromossomos (BANAEI-MOGHADDAM et al., 2015; MAKUNIN
2 et al., 2014; NAVARRO-DOMÍNGUEZ et al., 2017; VALENTE et al., 2017), sendo que
3 em alguns casos foram observados transcritos provenientes dos Bs (revisão em Valente
4 et al. 2016; Navarro-Domínguez et al. 2017).

5 A razão sexual e a ocorrência de cromossomos B foram correlacionadas em várias
6 populações de *A. scabripinnis*, nas quais distorções sazonais foram observadas, com
7 incremento da razão sexual em favor das fêmeas (MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA,
8 1994; PORTO-FORESTI et al., 1997; SILVA et al., 2014; VICENTE; MOREIRA-
9 FILHO; CAMACHO, 1996). Entretanto, até o momento, não foi totalmente elucidado se
10 os cromossomos B poderiam influenciar na alteração da razão sexual nesses peixes.

11 Estudos relacionando o desenvolvimento gonadal de machos e fêmeas com e sem
12 cromossomos B, indicaram uma extensão do pico reprodutivo para as fêmeas portadoras
13 do cromossomo adicional, sugerindo um possível papel adaptativo dos Bs (CORNELIO
14 et al., 2017). Adicionalmente, o hermafroditismo sincrônico, característica considerada
15 anormal para espécies gonocoristas como *Astyanax* (PRADO et al., 2011), foi
16 reconhecido como um evento inerente a *A. scabripinnis* (CORNELIO et al., 2017),
17 contribuindo na manutenção da razão sexual destes animais.

18 Considerando as evidências da provável influência do cromossomo B na razão
19 sexual destes animais, nosso objetivo foi caracterizar a expressão de dois genes de
20 expressão dimórfica (*amh* e *foxl2*) entre indivíduos adultos de *Astyanax scabripinnis*,
21 frente à ocorrência de cromossomos B, tendo em vista a diferenciação sexual durante o
22 desenvolvimento gonadal.

23

24 **Material e métodos**

25 *Caracterização do objeto de estudo*

26 Foram amostrados 61 exemplares (30 fêmeas; 30 machos e 1 hermafrodita) de
27 *Astyanax scabripinnis* adultos provenientes de Guaratinguetá (Fazenda Lavrinha) -
28 Estado de São Paulo, Brasil (22° 40'49.5"S e 45° 23'31.9"W). As coletas foram realizadas
29 ativamente com peneiras de malha 0,5 mm entre nós e passivamente com armadilhas do
30 tipo “covos”, em diferentes períodos de um ciclo reprodutivo (meses de novembro a
31 janeiro - período reprodutivo e meses de abril a junho - período não reprodutivo). Logo
32 após a captura, os peixes foram acondicionados em sacos plásticos com água e oxigênio
33 sob pressão, sendo conduzidos até a Estação Experimental de Salmonicultura
34 (APTA/UDC – Campos do Jordão – São Paulo) para processamento. Todo o

1 procedimento, desde a coleta, captura, manutenção e técnicas seguiram os padrões para
2 experimentação animal estabelecidos pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da
3 Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP-UEPG), com autorização legal fornecida
4 pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio – proc. 15115-
5 1).

6

7 *Citogenética clássica*

8 Para identificação dos animais com cromossomo B utilizou-se a técnica descrita
9 por Bertollo et al. (1978) para obtenção de cromossomos mitóticos e hibridização *in situ*
10 fluorescente (FISH) com sonda específica para o cromossomo B segundo Cornelio et al.
11 (2017). A heterocromatina foi visualizada pelo método de banda C segundo SUMNER
12 (1972), modificado por LUI et al (2012).

13

14 *Histologia*

15 Para confirmação do sexo e classificação do estágio de maturação durante o
16 desenvolvimento gonadal, foi realizado procedimento histológico. As gônadas
17 amostradas foram dissecadas e fixadas em solução de Bouin por 24h a temperatura
18 ambiente, posteriormente desidratadas, embebidas em parafina e então seccionadas entre
19 3 a 5 µm de espessura. Os cortes foram contra corados com hematoxilina e eosina e as
20 gônadas classificadas em dois grupos, de acordo com seu estágio macroscópico de
21 desenvolvimento, em maturação e maduras, segundo Vazzoler (1996).

22

23 *Extração de RNA e síntese de cDNA*

24 Todos os animais utilizados foram mantidos nas mesmas condições de
25 aclimação em laboratório (tanques de 250 litros com aeração constante e temperatura
26 controlada a 25°C, 12 horas de luz e alimentação com ração para peixes uma vez ao dia
27 por 48h) até a coleta das amostras de tecido. Após a dissecação, as gônadas foram
28 imediatamente acondicionadas em RNAlater (Ambion) para preservação. O RNA total
29 foi extraído através de homogeneização em TRIzol (Invitrogen) de acordo com protocolo
30 do fabricante e purificado com DNaseI recombinante (Invitrogen). Sua concentração foi
31 quantificada por espectrofotometria e a integridade verificada através da visualização das
32 bandas 28S e 18S em gel de agarose a 1%. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de
33 RNA total, com uso de primer oligo-dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) e transcriptase reversa Super
34 Script III (Invitrogen), sendo posteriormente diluído a 1:3 com água nuclease-free.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para obtenção de primers específicos para a qRT-PCR em *A. scabripinnis* foram desenhados primeiramente primers em regiões conservadas de *A. mexicanus* (accession GCA_000372685.1), a partir de sequências disponíveis na base de dados *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) em regiões de junção éxon-éxon das CDSs (coding sequences) (Tabela 1). Estes primers foram utilizados para amplificação por PCR convencional em gDNA de *A. scabripinnis* e após a padronização das reações, os produtos foram purificados utilizando o kit *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (GE Healthcare Amersham Biosciences), conforme as especificações do fabricante. Os produtos da PCR purificados foram sequenciados no *ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer* (Perking-Elmer) usando o kit *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Após análise das sequências nucleotídicas, foram finalmente desenhados primers específicos para *A. scabripinnis* para qRT-PCR dos genes confirmados (Tabela 1). Todo o procedimento de alinhamento, construção de primers e pesquisa no BLASTn foi realizado no suíte de ferramentas de biologia molecular e análise NGS do Geneious R11.

O número de indivíduos utilizados em cada grupo amostral encontra-se sumarizado na tabela 2. A qRT-PCR foi realizada no termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) usando SYBR Select Master Mix (Life), em um volume final de 12,7 µL, com 2 µL de cDNA por reação e 0,4 µL de cada primer (10 mM). Os parâmetros dos ciclos das reações foram: 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos a 95°C por 40 segundos e 60°C por 1 minuto para ambos os genes. Após a amplificação, o passo de dissociação foi realizado elevando a temperatura de 60°C a 95°C para criar a curva de melting e garantir a presença de um único produto de amplificação. As curvas de diluição foram geradas por diluição seriada (1:10) do cDNA usado para calcular as eficiências dos primers. As amostras sem valores de Ct ou com Ct inconsistente entre as réplicas (diferença de Ct > 2 ciclos) foram excluídas da análise.

Os dados da qPCR foram obtidos pelo software MxPro (Agilent Technologies) e normalizados contra os valores de β-actina e a quantificação obtida pelo método de Ct comparativo através de curva padrão (FERNANDINO et al., 2009). Os valores apresentados como média ± desvio padrão da média (SEM) foram analisados por one way ANOVA, teste t de Student e teste de Tukey p < 0.05, no software GraphPad Prism 7.

1 Tabela. 1 Primers desenhados usados para PCR convencional e qRT-PCR

Gene	Sequência do primer (5'-3')	Uso
Ame_amh_Fw1	CTGGGATGTTGAAGACGA	PCR Convencional
Ame_amh_Rv1	GAGGAATTAATCAGCTCCAGAA	PCR Convencional
Ame_foxl2_Fw1	ACGTTCTTGGGCTCAGAGGA	PCR Convencional
Ame_foxl2_Rv1	AGACTTGCCGGGTTGGAAGTG	PCR Convencional
Amh_rtf1	CCTCACTGCTCTTCCTGACG	qRT-PCR
Amh_rtr1	AAACACCCAACACAGCTTGC	qRT-PCR
Foxl2_rtF1	ACCCTCAGCCAGATCTACCA	qRT-PCR
Foxl2_rtR1	GCACCTTCTTGAAGCAGTCG	qRT-PCR
βActin F_RT	ATCATGAAGTGCGACGTGGA	qRT-PCR
βActin R_RT	TATTTACGCTCAGGTGGGGC	qRT-PCR

2

3 Tabela. 2 Quantidade de indivíduos utilizados na análise de expressão gênica

Gene	Gônadas em maturação					Gônadas maduras				Total
	♀(B+)	♀(B-)	♂(B+)	♂(B-)	IS*(♀) + (♂)	♀(B+)	♀(B-)	♂(B+)	♂(B-)	
<i>amh</i>	3	3	3	3	1 1	3	3	3	3	26
<i>foxl2</i>	4	4	4	4	1 1	6	4	4	6	38
Total										64*

4 *Os tecidos do hermafrodita sincrônico (IS – intersexo, com cromossomo B), são provenientes
5 do mesmo animal. Já para os demais indivíduos, cada tecido corresponde a um animal distinto.

6

7 Resultados

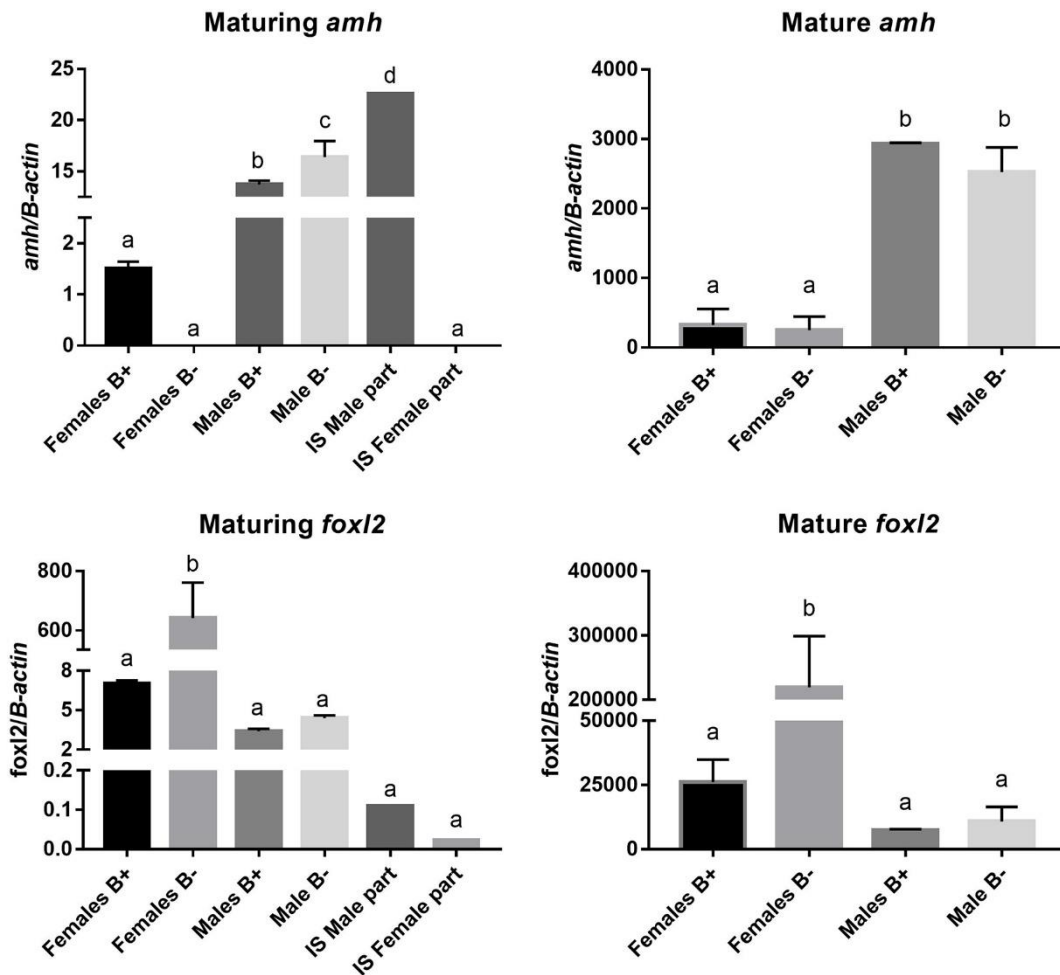
8

9 *Análise da expressão gênica de amh e foxl2*

10 As gônadas dos indivíduos analisados evidenciaram expressão bimodal
11 significativa (p -value < 0.05) para o gene o *amh* entre machos e fêmeas, independente da
12 presença do cromossomo B, embora fêmeas em maturação sem cromossomo B tenham
13 mostrado um menor nível de expressão. O indivíduo hermafrodita, caracterizado
14 morfológicamente como em maturação, evidenciou expressão do gene *amh* somente para
15 a parte masculina da gônada (Figura 1, Tabela 3).

16 As mesmas amostras de tecido gonadal quando analisadas para expressão do
17 gene *foxl2*, apontou diferenças significativas de expressão bimodal entre fêmeas com

1 cromossomos B e os demais grupos. Fêmeas com cromossomo B acusaram expressão
 2 bastante reduzidas de *foxl2* em relação aos demais grupos. A parte feminina da gônada
 3 do indivíduo hermafrodita não evidenciou expressão para *foxl2*. (Figura 1, Tabela 3).
 4



5
 6 Fig 1- Níveis de expressão relativa de *amh* e *foxl2* em gônadas em maturação e maduras de
 7 *A. scabripinnis* adultos. Os grupos significativamente diferentes entre si estão representados
 8 pelas diferentes letras. IS: Inter sexo (hermafrodita sincrônico).

9
 10 Tabela. 3 Análises estatísticas entre os grupos *maturing* e *mature*, ($p < 0.05$) para os
 11 genes *amh* e *foxl2*.

12 **Maturing *amh***

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff, 95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value	Significant?
Females B+ vs. Females B-	1,503 -0,9273 to 3,933	ns	0,3083	No
Females B+ vs. Males B+	-12,23 -14,66 to -9,804	****	<0,0001	Yes
Females B+ vs. Male B-	-14,88 -17,31 to -12,45	****	<0,0001	Yes

Females B+ vs. IS Male part	-21,05	-24,49 to -17,61	****	<0,0001	Yes
Females B+ vs. IS Female part	1,503	-1,934 to 4,94	ns	0,6211	No
Females B- vs. Males B+	-13,74	-16,17 to -11,31	****	<0,0001	Yes
Females B- vs. Male B-	-16,38	-18,81 to -13,95	****	<0,0001	Yes
Females B- vs. IS Male part	-22,55	-25,99 to -19,12	****	<0,0001	Yes
Females B- vs. IS Female part	0	-3,437 to 3,437	ns	>0,9999	No
Males B+ vs. Male B-	-2,646	-5,076 to -0,2156	*	0,0327	Yes
Males B+ vs. IS Male part	-8,815	-12,25 to -5,378	***	0,0001	Yes
Males B+ vs. IS Female part	13,74	10,3 to 17,17	****	<0,0001	Yes
Male B- vs. IS Male part	-6,169	-9,606 to -2,732	**	0,0016	Yes
Male B- vs. IS Female part	16,38	12,95 to 19,82	****	<0,0001	Yes
IS Male part vs. IS Female part	22,55	18,34 to 26,76	****	<0,0001	Yes

1

2 Mature *amh*

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff, 95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value	Significant?
Females B+ vs. Females B-	77,46 -536,4 to 691,3	ns	0,9762	No
Females B+ vs. Males B+	-2603 -3217 to -1989	****	<0,0001	Yes
Females B+ vs. Male B-	-2197 -2811 to -1583	****	<0,0001	Yes
Females B- vs. Males B+	-2681 -3294 to -2067	****	<0,0001	Yes
Females B- vs. Male B-	-2274 -2888 to -1660	****	<0,0001	Yes
Males B+ vs. Male B-	406,4 -207,4 to 1020	ns	0,2256	No

3

4 Maturing *foxl2*

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff, 95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value	Significant?
Females B+ vs. Females B-	-633,8 -919,8 to -347,8	****	<0,0001	Yes
Females B+ vs. Males B+	3,608 -282,4 to 289,6	ns	>0,9999	No
Females B+ vs. Male B-	2,636 -283,3 to 288,6	ns	>0,9999	No
Females B+ vs. IS Male part	6,91 -445,2 to 459,1	ns	>0,9999	No
Females B+ vs. IS Female part	6,997 -445,1 to 459,1	ns	>0,9999	No
Females B- vs. Males B+	637,4 351,4 to 923,4	****	<0,0001	Yes
Females B- vs. Male B-	636,4 350,5 to 922,4	****	<0,0001	Yes
Females B- vs. IS Male part	640,7 188,6 to 1093	**	0,0048	Yes
Females B- vs. IS Female part	640,8 188,7 to 1093	**	0,0048	Yes
Males B+ vs. Male B-	-0,9713 -286,9 to 285	ns	>0,9999	No

Males B+ vs. IS Male part	3,302	-448,8 to 455,4	ns	>0,9999	No
Males B+ vs. IS Female part	3,389	-448,8 to 455,5	ns	>0,9999	No
Male B- vs. IS Male part	4,274	-447,9 to 456,4	ns	>0,9999	No
Male B- vs. IS Female part	4,36	-447,8 to 456,5	ns	>0,9999	No
IS Male part vs. IS Female part	0,08675	-571,8 to 572	ns	>0,9999	No

1

2 **Mature *foxl2***

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value	Significant?
Females B+ vs. Females B-	-193318	-323028 to -63607	**	0,0030	Yes
Females B+ vs. Males B+	18886	-110825 to 148596	ns	0,9748	No
Females B+ vs. Male B-	15311	-100705 to 131328	ns	0,9810	No
Females B- vs. Males B+	212203	70113 to 354294	**	0,0029	Yes
Females B- vs. Male B-	208629	78919 to 338339	**	0,0015	Yes
Males B+ vs. Male B-	-3575	-133285 to 126136	ns	0,9998	No

3

4 B+, individual with B chromosome; B-, individual lacking B chromosome; IS, intersex; ns, not
5 significant, **** P < 0.0001, extremely significant; *** P 0.0001 to 0.001, extremely significant;
6 ** P 0.001 to 0.01, very significant; * P 0.01 to 0.05, significant.

7

8 **Discussão**

9 Este estudo é pioneiro em analisar a expressão dos genes *amh* e *foxl2* em gônadas
10 masculinas e femininas de peixes em diferentes estádios do desenvolvimento reprodutivo.
11 A espécie *Astyanax scabripinnis* foi escolhida por apresentar a ocorrência de
12 cromossomos B amplamente estudada (Moreira-Filho et al., 2004) e recentemente
13 caracterizada com a ocorrência de hermafroditismo funcional e possível masculinização
14 (Cornélio et al., 2017).

15 A expressão tipicamente bimodal de genes conservados entre os vertebrados na
16 cascata de determinação sexual, não apresentou o mesmo padrão, considerando a
17 presença/ausência de cromossomos B. As fêmeas sem cromossomos B demonstram um
18 comportamento bimodal esperado para a expressão dos genes *amh* e *foxl2*,
19 respectivamente. Contudo, o comportamento é atípico para as fêmeas que são portadoras
20 desses cromossomos. As fêmeas em maturação apresentam padrões de expressão destes
21 genes mais semelhantes ao dos machos e inverso ao das fêmeas que não carregam o
22 cromossomo adicional. Para os animais maduros e prontos para a reprodução este fato é

1 menos evidente para o gene *amh*, mas pode ser facilmente constatado para o *foxl2*.
2 Curiosamente, a parte feminina da gônada do indivíduo hermafrodita em maturação
3 (portador de cromossomo B), não expressou o gene *foxl2*. Por outro lado, as gônadas
4 masculinas foram mais conservadoras em relação a expressão dos genes *amh* e *foxl2*,
5 independente do estágio de maturação e da ocorrência de cromossomo B. Inclusive a parte
6 masculina da gônada do indivíduo hermafrodita teve alta expressão de *amh* quando em
7 maturação, de acordo com o comportamento típico esperado para machos.

8 A ausência de cromossomos sexuais morfologicamente distintos em *Astyanax*
9 (TENORIO et al., 2013) pode facilitar a ocorrência de hermafroditismo e inversões
10 sexuais. (CASTRO et al., 2018; CORNELIO et al., 2017). Este cenário ajuda a entender
11 padrões diferenciados e complexos de expressão de genes relacionados ao sexo.

12 O gene *foxl2* está associado ao desenvolvimento ovariano em todas as espécies estudadas
13 sob este aspecto (revisto em Bertho et al., 2016), mostrando uma expressão claramente
14 dimórfica e apresentando uma condição conservada para este gene entre os teleósteos de
15 maneira geral (SIEGFRIED, 2010). Como *foxl2* promove o desenvolvimento ovariano
16 (revisto em BERTHO et al., 2016), é possível inferir que animais fêmeas sem
17 cromossomos B possam amadurecer mais rápido em relação aos indivíduos portadores
18 do cromossomo B, uma vez que uma maior expressão, como encontrado nas fêmeas sem
19 cromossomos B, favorece o desenvolvimento precoce e a maturação da gônada. Como
20 consequência, as fêmeas sem cromossomos B podem possuir um período reprodutivo
21 antecipado em relação as fêmeas portadoras do cromossomo adicional. Cornélio et al.
22 (2017) relataram que fêmeas de *A. scabripinnis* sem cromossomos B possuem atividade
23 reprodutiva de seis meses, se estendendo de julho a dezembro, enquanto fêmeas
24 portadoras de cromossomo B apresentaram pico reprodutivo mais curto e tardio, de
25 dezembro a fevereiro. Ter um maior período reprodutivo é uma vantagem adaptativa
26 importante para uma espécie como *A. scabripinnis* que mantém populações em pequenos
27 riachos de altitude e está sujeita a intensas variações ambientais e a predação (CASTRO
28 et al., 2014a, 2014b; CORNELIO et al., 2017).

29 Vários estudos citogenéticos em *A. scabripinnis* chamam a atenção para a
30 distorção da razão sexual em favor das fêmeas e a sua associação significativa com a
31 frequência de cromossomos B, com um número altamente desproporcional de machos
32 sem esses cromossomos. (MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1994; PORTO-FORESTI
33 et al., 1997; SILVA et al., 2014; VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 1996).
34 Dessa forma, pode-se considerar com os dados obtidos que tal distorção da razão sexual

1 a favor das fêmeas portadoras do cromossomo B seja um mecanismo de compensação na
2 manutenção deste cromossomo. Recentemente, CASTRO et al. (2018) analisaram os
3 perfis de expressão do gene *dmrt1* em gônadas de machos e fêmeas adultos de *A.*
4 *scabripinnis* frente a presença e ausência de cromossomos B e relataram uma
5 superexpressão do gene em gônadas em maturação de machos portadores do cromossomo
6 adicional. Como as fêmeas portadoras de cromossomos B se reproduzem de dezembro a
7 fevereiro, ou seja, com pico de atividade reprodutiva mais curta e tardia do período
8 reprodutivo típico que vai de julho a dezembro, os machos portadores do cromossomo B
9 podem ter uma extensão da espermatogênese e garantir a reprodução das fêmeas
10 portadoras daqueles cromossomos adicionais. Nossos achados para a expressão dos genes
11 *amh* e principalmente *foxl2* corroboram com o cenário de expressão gênica diferencial
12 associada com a presença/ausência dos Bs. Importante notar que há uma interessante
13 correlação positiva na extensão do ciclo reprodutivo dos machos portadores de Bs
14 (referente à expressão diferencial do gene *dmrt1*, segundo CASTRO et al., (2018)) e das
15 fêmeas portadoras de Bs (referente ao gene *foxl2*, de acordo com os resultados aqui
16 descritos).

17 Tais resultados destacam que a presença de cromossomos B, de alguma maneira,
18 está alterando significativamente os perfis de expressão dos principais genes relacionados
19 ao sexo (*foxl2* e *dmrt1*, conforme CASTRO et al., (2018)). Como esse cromossomo é
20 constituído quase que totalmente por grandes blocos heterocromáticos (MAISTRO;
21 FORESTI; OLIVEIRA, 1994; MOREIRA-FILHO; GALETTI; BERTOLLO, 2004), fica
22 ainda a ser esclarecido se o próprio B é portador de algum desses genes ou cópia duplicada
23 funcional. Assim, é uma questão ainda em aberto como se dá a regulação destes genes
24 frente à presença do cromossomo B em *Astyanax scabripinnis*.

25

26 **Agradecimentos**

27 Os autores são gratos ao Instituto Chico Mendes de Conservação da
28 Biodiversidade (ICMBio). Este trabalho teve suporte pelo Conselho Nacional de
29 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, número de processo 407187/2016-2),
30 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, bolsa a JPC e
31 Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e
32 Tecnológico do Estado do Paraná, número de concessão 16174).

33

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como proposta investigar o nível de expressão gênica de alguns genes candidatos à determinação sexual, frente à ocorrência de cromossomos B no peixe *Astyanax scabripinnis*. Este estudo é pioneiro em apresentar esta abordagem em estágios distintos do desenvolvimento gonadal desta espécie.

Os resultados obtidos indicam que alterações nos perfis de expressão desses genes se encontram fortemente correlacionados com a presença/ausência dos cromossomos B, indicando o provável papel adaptativo destes cromossomos na extensão do ciclo reprodutivo, notadamente em relação ao gene *dmrt1* e *foxl2* o que poderia favorecer a manutenção desses cromossomos na espécie. Assim sendo, os resultados obtidos refutam a noção de que os cromossomos Bs sejam elementos inertes e sem influência nos organismos portadores. Neste sentido, avanços significativos foram alcançados no entendimento da biologia dos cromossomos B, abrindo perspectivas futuras para a elucidação do seu conteúdo genético, bem como da dinâmica da regulação dos genes investigados em função desses cromossomos.

Além dos resultados aqui obtidos, são lançadas ideias de futuros trabalhos que poderiam reforçar ainda mais o cenário biológico, a descrição de qual momento no desenvolvimento ontogenético ocorre a expressão desses genes e como isso estaria relacionado aos cromossomos Bs. Também informações meióticas, que poderiam elucidar por quais os mecanismos os cromossomos Bs são transmitidos irregularmente durante a meiose, não obedecendo princípios mendelianos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABILHOA, V. Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei,
2 Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. **Revista Brasileira**
3 **de Zoologia**, v. 24, n. 4, p. 997–1005, 2007.
- 4 ADOLFI, M. C. et al. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9*
5 during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax*
6 *altiparanae*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 2, 2015.
- 7 AKEN, B. L. et al. The Ensembl gene annotation system. **Database**, v. 2016, p. baw093,
8 23 jun. 2016.
- 9 ARAI, R. Fish Karyotypes. p. 1–347, 2011.
- 10 ARTONI, R. F. et al. *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae):
11 evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical**
12 **Ichthyology**, v. 4, n. 2, jun. 2006.
- 13 BANAEI-MOGHADDAM, A. M. et al. Genes on B chromosomes: old questions
14 revisited with new tools. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1849, n. 1, p. 64–70, jan.
15 2015.
- 16 BARBOSA, P. et al. Identification and chromosome mapping of repetitive elements in
17 the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, v. 143, n.
18 1, p. 55–62, fev. 2015.
- 19 BARBOSA, P. et al. Variability and evolutionary implications of repetitive DNA
20 dynamics in genome of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Comparative**
21 **Cytogenetics**, v. 11, n. 1, p. 143–162, 6 mar. 2017.
- 22 BERTHO, S. et al. *Foxl2* and Its Relatives Are Evolutionary Conserved Players in
23 Gonadal Sex Differentiation. **Sexual Development**, v. 10, n. 3, p. 111–129, 2016.
- 24 BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic
25 considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of**
26 **Genetics**, v. 1, p. 103–120, 1978.
- 27 BERTOLLO, L.; CIOFFI, M.; MOREIRA-FILHO, O. Direct Chromosome Preparation
28 from Freshwater Teleost Fishes. In: **Fish Cytogenetic Techniques**. [s.l.] CRC Press,
29 2015. p. 21–26.
- 30 BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: **Comissão**
31 **Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguaí. Poluição e piscicultura**. São Paulo: Instituto
32 de Pesca, 1972. p. 108.
- 33 BRUFORD, M. W. et al. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In:
34 HOELZELL, A. R. (Ed.). . **Molecular genetics analyses of populations: a Practical**
35 **Approach**. Oxford: IRL Press, 1992. p. 225–269.
- 36 BURT, A.; TRIVERS, R. **Genes in Conflict**. [s.l.: s.n.].
- 37 CAMACHO, J. P. M. B chromosomes. In: GREGORY, T. R. (Ed.). . **The Evolution of**
38 **the Genome**. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2005. p. 223–286.
- 39 CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome
40 evolution. n. February 1999, p. 163–178, 2000.
- 41

- 1 CASTRO, J. P. et al. Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei:
2 Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences.
3 **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 25, n. 1, 2014a.
- 4 CASTRO, J. P. et al. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species
5 complex (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 2, p. 429–438, jun.
6 2014b.
- 7 CASTRO, J. P. et al. Differential Expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis*
8 (Teleostei, Characidae) Is Correlated with B Chromosome Occurrence. **Zebrafish**, p.
9 zeb.2018.1650, 18 dez. 2018.
- 10 CHEN, S. et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex
11 chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. **Nature genetics**, v. 46, n. 3,
12 p. 253–60, mar. 2014.
- 13 CORNELIO, D. et al. Hermaphroditism can compensate for the sex ratio in the *Astyanax*
14 *scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae): expanding the B chromosome
15 study model. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 3, p. 681–689, 6 set. 2017.
- 16 CUI, Z. et al. Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in
17 Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Scientific reports**, v. 7, p. 42213, 16 fev.
18 2017.
- 19 DE MITCHESON, Y. S.; LIU, M. Functional hermaphroditism in teleosts. **Fish and**
20 **Fisheries**, v. 9, n. 1, p. 1–43, mar. 2008.
- 21 DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an
22 overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208,
23 n. 3–4, p. 191–364, jun. 2002.
- 24 ERDMAN, S. E.; BURTIS, K. C. The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc
25 finger related DNA binding domain. **The EMBO journal**, v. 12, n. 2, p. 527–35, fev.
26 1993.
- 27 ESCHEMEYER, W. **Catalog of Fishes: Genera, species, references**. Disponível em:
28 <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>.
29 Acesso em: 16 mar. 2018.
- 30 FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations
31 of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v. 141, n. 3, p. 328–32,
32 2004.
- 33 FERNANDINO, J. I. et al. Dimorphic Expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (Ovarian
34 Aromatase) during Early Gonadal Development in Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*.
35 **Sexual Development**, v. 2, n. 6, p. 316–324, 10 mar. 2009.
- 36 FERNANDINO, J. I. et al. Analysis of Sexually Dimorphic Expression of Genes at Early
37 Gonadogenesis of Pejerrey *Odontesthes bonariensis* Using a Heterologous Microarray.
38 **Sexual Development**, v. 5, n. 2, p. 89–101, 2011.
- 39 FERNANDINO, J. I.; GUILGUR, L. G.; SOMOZA, G. M. *Dmrt1* expression analysis
40 during spermatogenesis in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. **Fish Physiology and**
41 **Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 231–240, 25 set. 2006.
- 42 FERREIRA NETO, M. et al. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax*

- 1 altiparanae (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular**
2 **Biology**, v. 32, n. 4, p. 792–796, 9 out. 2009.
- 3 FERREIRA-NETO, M. et al. Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus*
4 (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. **Comparative**
5 **Cytogenetics**, v. 6, n. 1, p. 29–40, 24 jan. 2012.
- 6 FISHER, R. A. **The Genetical Theory of Natural Selection**. New York: Oxford
7 University Press, 1930.
- 8 FORCONI, M. et al. Characterization of Sex Determination and Sex Differentiation
9 Genes in *Latimeria*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e56006, 25 abr. 2013.
- 10 FROESE, R.; PAULY, D. **Fishbase**. Disponível em: <www.fishbase.org>.
- 11 GERY, J. **Characoids of the World**. New Jersey: T. F. H. Publications, 1977.
- 12 GODWIN, J.; LUCKENBACH, J. A.; BORSKI, R. J. Ecology meets endocrinology:
13 environmental sex determination in fishes. **Evolution and Development**, v. 5, n. 1, p.
14 40–49, 2003.
- 15 GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do Alto Rio**
16 **Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, 2007.
- 17 HACKSTEIN, J. H. P. et al. Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved
18 supernumerary chromosome? **BioEssays**, v. 18, p. 317–323, 1996.
- 19 HAMILTON, W. D. Extraordinary Sex Ratios. **Science**, v. 156, n. April, p. 477–488,
20 1967.
- 21 HATTORI, R. S. et al. A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a
22 critical role in sex determination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.
23 109, n. 8, p. 2955–2959, 21 fev. 2012.
- 24 HATTORI, R. S. et al. Genotypic sex determination in teleosts: Insights from the testis-
25 determining amhy gene. **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, p. 55–59,
26 out. 2013.
- 27 HERPIN, A.; SCHARTL, M. *Dmrt1* genes at the crossroads: a widespread and central
28 class of sexual development factors in fish. **The FEBS journal**, v. 278, n. 7, p. 1010–9,
29 abr. 2011.
- 30 HODGKIN, J. The remarkable ubiquity of DM domain factors as regulators of sexual
31 phenotype: ancestry or aptitude? **Genes & Development**, v. 16, n. 18, p. 2322–2326, 15
32 set. 2002.
- 33 JANES, D. E. et al. Molecular evolution of *Dmrt1* accompanies change of sex-
34 determining mechanisms in reptilia. **Biology Letters**, v. 10, n. 12, p. 20140809–
35 20140809, 24 dez. 2014.
- 36 JAVONILLO, R. et al. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei:
37 Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular**
38 **Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 2, p. 498–511, fev. 2010.
- 39 JONES, R. N.; REES, H. **B chromosomes**. London: Academic Press, 1982.
- 40 JOSSO, N.; DI CLEMENTE, N.; GOUÉDARD, L. Anti-Müllerian hormone and its

- 1 receptors. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 179, n. 1–2, p. 25–32, 20 jun. 2001.
- 2 KAMIYA, T. et al. A Trans-Species Missense SNP in Amhr2 Is Associated with Sex
3 Determination in the Tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). **PLoS Genetics**, v. 8, n.
4 7, p. e1002798, 12 jul. 2012.
- 5 KAVALCO, K. F. et al. Comparative Cytogenetics and Molecular Phylogeography in the
6 Group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae).
7 **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, p. 108–119, 2011.
- 8 KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design
9 program Primer3. **Bioinformatics**, v. 23, n. 10, p. 1289–1291, 2007.
- 10 LAMBETH, L. S. et al. Over-expression of DMRT1 induces the male pathway in
11 embryonic chicken gonads. **Developmental biology**, v. 389, n. 2, p. 160–72, 15 maio
12 2014.
- 13 LUI, R. L. et al. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-
14 banding technique. **Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological
15 Stain Commission**, v. 87, n. 7, p. 433–8, out. 2012.
- 16 MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. New Occurrence of a Macro-B-
17 Chromosome in *Astyanax-Scabripinnis-Paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae).
18 **Brazilian Journal of Genetics**, v. 17, p. 153–156, 1994.
- 19 MAKUNIN, A. I. et al. Genes on B chromosomes of vertebrates. **Molecular
20 cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 99, 2014.
- 21 MANK, J. E.; PROMISLOW, D. E. L.; AVISE, J. C. Evolution of alternative sex-
22 determining mechanisms in teleost fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**,
23 v. 87, n. 1, p. 83–93, 2006.
- 24 MANTOVANI, M. et al. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar
25 organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding
26 karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, n. 3, p. 161–8, 2000.
- 27 MARTÍNEZ, P. et al. Genetic architecture of sex determination in fish: applications to
28 sex ratio control in aquaculture. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 340, 2014.
- 29 MASUYAMA, H. et al. Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the
30 sex determination by Dmy in the medaka. **Chromosome research : an international
31 journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome
32 biology**, v. 20, n. 1, p. 163–76, jan. 2012.
- 33 MATSON, C. K.; ZARKOWER, D. Sex and the singular DM domain: insights into
34 sexual regulation, evolution and plasticity. **Nature Reviews Genetics**, 7 fev. 2012.
- 35 MATSUDA, M. et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male
36 development in the medaka fish. **Nature**, v. 417, n. 6888, p. 559–563, 30 maio 2002.
- 37 MESTRINER, C. A. et al. Structural and functional evidence that a B chromosome in the
38 characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, n. August
39 1999, p. 1–9, 2000.
- 40 MIRANDE, M. J. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei:
41 Characiformes). **Cladistics**, v. 25, n. 6, p. 574–613, dez. 2009.

- 1 MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. *Astyanax scabripinnis*: a species complex.
2 **Brazil Journal Genetics**, v. 14, p. 331–357, 1991.
- 3 MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI, P. M.; BERTOLLO, L. A C. B chromosomes in the
4 fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural
5 populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 230–234, 2004.
- 6 MORELLI, S. et al. Cytogenetic Considerations on the Genus *Astyanax* (Pisces,
7 Characidae). I. Karyotypic Variability. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 235–244, jan. 1983.
- 8 MYOSHO, T. et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka,
9 *Oryzias luzonensis*. **Genetics**, v. 191, n. 1, p. 163–70, maio 2012.
- 10 NAKAMURA, M. Sex determination in amphibians. **Seminars in cell & developmental**
11 **biology**, v. 20, n. 3, p. 271–82, maio 2009.
- 12 NANDA, I. et al. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y
13 chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. **Proceedings of the National Academy of**
14 **Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 18, p. 11778–83, 3 set. 2002.
- 15 NAVARRO, R. D. et al. Influência do sexo no desempenho de lambari prata (*Astyanax*
16 *scabripinnis*, Jenyns, 1842). **Zootecnia Tropical**, v. 21, n. 4, p. 359–369, 2003.
- 17 NAVARRO-DOMÍNGUEZ, B. et al. Protein-coding genes in B chromosomes of the
18 grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45200, 3 abr. 2017.
- 19 NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 3rd. ed. New York: John Wiley & Sons, 2006.
- 20 NOKKALA, S. et al. The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in
21 *Cacopsylla peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). **Genetica**, v. 119, p. 327–332,
22 2003.
- 23 OLIVEIRA, C. et al. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae
24 (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive
25 ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 275, 26 dez. 2011.
- 26 OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from
27 chromosomes to populations. **Fish physiology and biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81–100,
28 mar. 2009.
- 29 PANDIAN, T. J. **Genetic Sex Differentiation in Fish**. [s.l.] Science Publishers
30 Enfield/CRC Press, 2012.
- 31 PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Chromosomal evolution in the neotropical characin
32 *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **The Nucleus**, v. 50, n. 3, p. 519–543, 2007.
- 33 PENMAN, D. J.; PIFERRER, F. Fish Gonadogenesis. Part I: Genetic and Environmental
34 Mechanisms of Sex Determination. **Reviews in Fisheries Science**, v. 16, n. sup1, p. 16–
35 34, 15 set. 2008.
- 36 PEREIRA FILHO, H. P. et al. BIOLOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS DE
37 LAMBARI-PRATA, *Astyanax scabripinnis* Jenyns, 1842 (Characidae;
38 Tetragonopterinae; Teleostei) EM CONDIÇÕES DE CATIVEIRO. **Ciência Animal**
39 **Brasileira**, v. 12, n. 4, 21 dez. 2011.
- 40 PFENNIG, F.; STANDKE, A.; GUTZEIT, H. O. The role of Amh signaling in teleost
41 fish – Multiple functions not restricted to the gonads. **General and Comparative**

- 1 **Endocrinology**, v. 223, p. 87–107, nov. 2015.
- 2 PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic Analysis Using Quantitative,
3 High-Sensitivity, Fluorescence Hybridization. **Proceedings of the National Academy of**
4 **Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 9, p. 2934–2938, 1986.
- 5 PORTO-FORESTI, F. et al. **Estimated frequency of B-chromosomes and population**
6 **density of Astyanax scabripinnis paranae in a small stream****Brazilian Journal of**
7 **Genetics**, 1997.
- 8 PRADO, P. S. et al. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a
9 Southeastern Brazilian reservoir. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7,
10 p. 1879–1887, out. 2011.
- 11 RAYMOND, C. S. et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining
12 genes. **Nature**, v. 391, n. 6668, p. 691–5, 12 fev. 1998.
- 13 REIS, R. E. et al. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish**
14 **Biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, jul. 2016.
- 15 REIS, R. E.; O, K. S.; FERRARIS, C. J. J. **Check List of the Freshwater Fishes of**
16 **South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.
- 17 REY, R. et al. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its
18 regulation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 211, n. 1–2, p. 21–31, 15 dez.
19 2003.
- 20 RODRÍGUEZ-MARÍ, A. et al. Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-
21 Müllerian hormone (Amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad
22 development. **Gene expression patterns : GEP**, v. 5, n. 5, p. 655–67, jun. 2005.
- 23 SALARO, A. L. et al. Avanços na nutrição e produção de lambaris. In: TAVARES-DIAS,
24 M.; MARIANO, W. S. (Eds.). . **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Carlos:
25 [s.n.]. p. 491–502.
- 26 SHIBATA, K.; TAKASE, M.; NAKAMURA, M. The *Dmrt1* expression in sex-reversed
27 gonads of amphibians. **General and comparative endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 232–
28 41, jul. 2002.
- 29 SIEGFRIED, K. R. In search of determinants: gene expression during gonadal sex
30 differentiation. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 8, p. 1879–1902, maio 2010.
- 31 SILVA, D. M. Z. DE A. et al. Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH
32 Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae*
33 (Teleostei, Characiformes). **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94896, 15 abr. 2014.
- 34 SMITH, C. A. et al. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex
35 determination in the chicken. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 267–71, 10 set. 2009.
- 36 SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.
37 **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304–6, nov. 1972.
- 38 SUN, W. et al. *Dmrt1* is required for primary male sexual differentiation in Chinese soft-
39 shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4433, 30 dez. 2017.
- 40 TAKEHANA, Y. et al. Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the Y
41 chromosome in the fish *Oryzias dancena*. **Nature Communications**, v. 5, 20 jun. 2014.

- 1 TENORIO, R. C. C. DE O. et al. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes:
2 Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. **Neotropical Ichthyology**, v.
3 11, n. 3, p. 553–564, jun. 2013.
- 4 TRUKHINA, A. V et al. The variety of vertebrate mechanisms of sex determination.
5 **BioMed research international**, v. 2013, p. 587460, 2013.
- 6 UBEDA-MANZANARO, M. et al. Expression profiling of the sex-related gene *Dmrt1* in
7 adults of the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus* (Bloch and Schneider, 1801).
8 **Gene**, v. 535, n. 2, p. 255–65, 10 fev. 2014.
- 9 UNTERGASSER, A. et al. Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids**
10 **Research**, v. 40, n. 15, 2012.
- 11 VALENTE, G. T. et al. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology.
12 **Chromosoma**, v. 126, n. 1, p. 73–81, 24 fev. 2017.
- 13 VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: an overview. In:
14 MALABARBA, L. R. et al. (Eds.). . **Phylogeny and Classification of neotropical**
15 **Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 1–11.
- 16 VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e**
17 **prática**. Maringá: EDUEM, 1996.
- 18 VAZZOLER, P.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento
19 reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei; Ostariophys). **Revista**
20 **Brasileira de Biologia**, v. 52, n. 4, p. 624–640, 1992.
- 21 VEREGUE, A. M. L.; ORSI, M. L. Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis*
22 *paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae), do ribeirão das Marrecas, bacia do rio
23 Tibagi, Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 1, mar. 2003.
- 24 VICARI, M. R. et al. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax*
25 *scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and**
26 **Molecular Biology**, v. 31, p. 173–179, 2008.
- 27 VICARI, M. R. et al. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax*
28 *scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, n. 8, p. 1073–
29 1081, 2011.
- 30 VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. Sex-ratio distortion
31 associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei,
32 Characidae). **Cytogenetics and cell genetics**, v. 74, p. 70–75, 1996.
- 33 VOLFF, J.-N. Sex determination in fish. **Genome Biology**, v. 3, n. 9, p. reports0052,
34 2002.
- 35 VON HOFSTEN, J.; LARSSON, A.; OLSSON, P. E. Novel steroidogenic factor-1
36 homolog (*ff1d*) is coexpressed with anti-Müllerian hormone (AMH) in zebrafish.
37 **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of**
38 **Anatomists**, v. 233, n. 2, p. 595–604, jun. 2005.
- 39 WANG, X. G.; ORBAN, L. Anti-Müllerian hormone and 11 beta-hydroxylase show
40 reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males.
41 **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of**
42 **Anatomists**, v. 236, n. 5, p. 1329–38, maio 2007.

- 1 WARNER, R. R.; ROSS ROBERTSON, D.; LEIGH, E. G. Sex change and sexual
2 selection. **Science**, v. 190, n. 4215, p. 633–638, 1975.
- 3 WEBSTER, K. A. et al. Dmrt1 is necessary for male sexual development in zebrafish.
4 **Developmental Biology**, v. 422, n. 1, p. 33–46, fev. 2017.
- 5 YANO, A. et al. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene
6 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Current biology : CB**, v. 22, n. 15, p. 1423–8,
7 7 ago. 2012.
- 8 YANO, A. et al. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved
9 male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. **Evolutionary applications**,
10 v. 6, n. 3, p. 486–96, abr. 2013.
- 11 YOSHIDA, K. et al. B chromosomes have a functional effect on female sex determination
12 in lake victoria cichlid fishes. **PLoS Genetics**, v. 7, 2011.
- 13 ZHANG, T.; ZARKOWER, D. DMRT proteins and coordination of mammalian
14 spermatogenesis. **Stem Cell Research**, v. 24, p. 195–202, out. 2017.
- 15 ZHU, L. et al. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of
16 intertwined zinc fingers. **Genes and Development**, v. 14, n. 14, p. 1750–1764, 2000.
- 17
- 18

- 1 **7. ANEXO**
- 2 Artigo publicado correspondente ao capítulo I
- 3

Differential Expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) Is Correlated with B Chromosome Occurrence

Jonathan Pena Castro,¹ Ricardo Shohei Hattori,² Túlio Teruo Yoshinaga,³
Dúlio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva,⁴ Fausto Foresti,⁴ Mateus Henrique Santos,⁵
Mara Cristina Almeida,⁵ and Roberto Ferreira Artoni^{1,5}

Abstract

Astyanax is an abundant fish genus in South America. Some species of this group are characterized by the presence of B chromosomes and absence of morphologically differentiated sex chromosomes. In this study, we used quantitative real-time polymerase chain reaction to characterize mRNA expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis* gonads. Maturing gonads of males with the B chromosome overexpressed *dmrt1*. Our findings suggest that B chromosomes may have an adaptive role in *A. scabripinnis* sex determination and maintenance.

Keywords: *dmrt1*, sex determination, sex differentiation, sex ratio, hermaphroditism, fish

Introduction

ASTYANAX BAIRD AND GIRAD, 1854, is a genus of freshwater fish abundant in South America. To date, their estimated diversity is nearly 200 species¹ with a wide distribution along Neotropical continent.² *Astyanax* contains numerous cryptic species complexes, with *Astyanax scabripinnis* being among the most representative.³ This species complex has a conspicuous karyotype characteristic, described in several allopatric populations: the occurrence of B chromosomes.⁴ B chromosomes are supernumerary genetic elements found in all eukaryotic groups, which differ from standard complement chromosomes (A chromosomes), did not pair with any A chromosome in meiosis and exhibit irregular forms of inheritance.⁵ Little is known about details of genomic composition and the origin of these genomic elements, but it is a consensus that in most cases, B chromosomes are considered nonfunctional and have no essential genes whose presence does not affect the carrier's phenotype.^{6–8} However, with the advancement of molecular techniques and comparative population studies, functional evidence for this chromosome has

been described for various organisms in greater detail about their origin and evolution.⁹

Sex ratio and B chromosome occurrence has been obtained for *A. scabripinnis* populations and seasonality distortions was observed, with distortion of the sex ratio in behalf of females and their significant association with the frequency of these B chromosomes, with a highly disproportionate number of males without these chromosomes.^{10–13} Interestingly, although chromosomal variability is wide, no morphologically distinct sex chromosomes have been detected in *A. scabripinnis*.¹⁴ Nevertheless, males during the reproductive season clearly possess secondary sexual characters such as bony hooks on the anal fin.¹⁵ Hermaphroditism was recently recognized as typical for *A. scabripinnis*, although the genetic factors involved in their primary sex determination and gonad differentiation remain unknown.¹⁶

Primary sex determination in vertebrates involves both genetic and environmental mechanisms, with temperature-dependent sex determination being a well-known example of the latter.¹⁷ This complexity means that we still have not fully resolved how sex is determined for the majority of fish species. For

¹Departamento de Genética e Evolução, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e Genética Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil.

²Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão, UPD-CJ (APTA/SAA), São Paulo, Brazil.

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Cirurgia, Universidade de São Paulo, Butantã, São Paulo, Brazil.

⁴Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil.

⁵Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.