



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ANÁLISE GENÔMICA DE REGIÕES ASSOCIADAS A DETERMINAÇÃO DO SEXO
EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

NAYELLE MEYRE LISBOA SILVA

BRASÍLIA/DF
OUTUBRO DE 2024



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE GENÔMICA DE REGIÕES ASSOCIADAS A DETERMINAÇÃO DO SEXO
EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

NAYELLE MEYRE LISBOA SILVA

Dr. ALEXANDRE RODRIGUES CAETANO

Dra. PATRÍCIA IANELLA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO:

**BRASÍLIA/DF
OUTUBRO DE 2024**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SILVA, N. M. L. Análise genômica de regiões associadas a determinação do sexo em tambaqui (*Colossoma macropomum*). Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024, 129 p. Tese de doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Nayelle Meyre Lisboa. Análise genômica de regiões associadas a determinação do sexo do tambaqui (*Colossoma macropomum*). Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2024. 122 p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2024.

1. GWAS 2. Piscicultura. 3. SNPs. 4.XX/XY

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE GENÔMICA DE REGIÕES ASSOCIADAS A DETERMINAÇÃO DO SEXO
EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

NAYELLE MEYRE LISBOA SILVA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTORA EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

ALEXANDRE RODRIGUES CAETANO, Doutor (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) (ORIENTADOR)

PATRÍCIA IANELLA, Doutora (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) (COORIENTADORA)

CONCEPTA MARGARET MCMANUS PIMENTEL, Doutora (Universidade de Brasília) (EXAMINADORA INTERNA)

LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO, Doutora (Universidade Federal do Oeste da Bahia) (EXAMINADORA EXTERNA)

MARCELO DE BELLO CIOFFI, Doutor (Universidade Federal de São Carlos) (EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 31 DE OUTUBRO de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus por ter me dado a vida, oportunidade de estudar, me graduar e ser doutora, pois sem o consentimento dele nada disso seria possível.

A minha família de criação que cuidou de mim até os 6 anos (entre 10-12 anos também) com amor, zelo e carinho. Influenciaram muito na formação da minha personalidade, portanto a pessoa que me tornei é principalmente devido ao que vivi nessa fase em que tudo foi maravilhoso.

A minha mãe biológica Rosimeire que me deu a vida, um lar e apoio, pois sem isso também não seria possível chegar até aqui.

Ao meu esposo amoroso Danilo que me proporciona tantos momentos de alegria, sempre esteve ao meu lado me apoiando e tornou tudo mais leve e prazeroso e que sem ele tudo seria mais difícil.

Aos meus orientadores Patrícia e Alexandre que sempre me auxiliaram na escrita e desenvolvimento da tese, além de terem sido muito compreensíveis em momentos difíceis. Os aprendizados obtidos com eles vão muito além da tese.

Aos meus colegas de trabalho que são companhias agradáveis e proporcionaram bons momentos.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilidade da infraestrutura para realização dos experimentos e análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Universidade de Brasília, pela oportunidade da realização do Doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo acesso ao portal de periódicos e pela bolsa.

Viver é um rasgar-se e remendar-se.

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 OBJETIVOS.....	5
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.3.1 Descrição Biológica do tambaqui (<i>Collossoma macropomum</i>).....	6
1.3.2 Produção do tambaqui.....	8
1.3.3 Determinação e diferenciação do sexo em teleósteos.....	9
1.3.3.1 Determinação genética do sexo.....	10
1.3.3.2 Determinação ambiental do sexo.....	11
1.3.3.3 Diferenciação sexual gonadal em teleósteos.....	12
1.3.3.4 Desenvolvimento de ferramentas determinantes do sexo em teleósteos.....	13
1.3.3.5 Determinação e diferenciação do sexo em tambaqui.....	15
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2 MAPEAMENTO BIBLIOGRÁFICO DA DETERMINAÇÃO DO SEXO EM PEIXES.....	26
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	29
2.1 INTRODUÇÃO.....	31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.3 RESULTADOS.....	37
2.4 DISCUSSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO 3 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DETERMINANTES DO SEXO EM TAMBAQUI.....	61
RESUMO.....	62
ABSTRATC.....	64
3.1 INTRODUÇÃO.....	66
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
3.2.1 Seleção das amostras.....	68

3.2.2 Extração de DNA e genotipagem com painel de média densidade.....	69
3.2.3 Estruturação populacional e parentesco.....	69
3.2.4 Obtenção do mapa genético.....	70
3.2.5 Estudo de associação genômica ampla – GWAS.....	70
3.3 RESULTADOS.....	72
3.3.1 Seleção das amostras.....	72
3.3.2 Estruturação populacional e parentesco.....	74
3.3.3 Estudo de associação genômica ampla com painel Axiom SerraSNP.....	76
3.4 DISCUSSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE A.....	86
CAPÍTULO 4 PROSPECÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES CANDIDATOS A DETERMINAÇÃO DO SWXO NO TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>)	88
RESUMO.....	89
ABSTRACT.....	91
4.1 INTRODUÇÃO.....	93
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	95
4.2.1 Identificação de potenciais genes candidatos.....	95
4.2.2 Desenho dos primers para sequenciamento dos genes associados a determinação do sexo.....	96
4.2.3 Estudo de associação genômica ampla-GWAS.....	97
4.3 RESULTADOS.....	99
4.3.1 Identificação de potenciais genes candidatos.....	99
4.3.2 Desenho dos primers, PCR e sequenciamento.....	103
4.3.3 Estudo de associação genômica ampla com SNPs descobertos e com painel Axiom SerraSNP.....	111
4.4 DISCUSSÃO.....	113
REFERÊNCIAS.....	117
CONCLUSÃO.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Distribuição natural do tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) nas bacias do rio Amazonas e Orinoco.....	6
Figura 1.2 - Formato e coloração do corpo do tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) ao longo de seu desenvolvimento.....	7
Figura 1.3 - Representação esquemática do processo de produção de progênie 100% fêmeas usando macho com sexo revertido (XX) considerando sistema genético XX/XY.....	9
Figura 1.4 - Esquema demonstrando os principais mecanismos de determinação e diferenciação do sexo em peixes.....	10
Figura 2.1 – Diagrama da análise de citações usadas no estudo.....	36
Figura 2.2 - Mapa de calor para países que publicam artigos sobre determinação do sexo em peixes. Um azul mais escuro significa mais publicações.....	37
Figura 2.3 – Documentos publicados sobre a determinação do sexo em peixes. (A) Número de artigos por ano, (B) tipo de documento, (C) principais instituições, (D) principais jornais e revistas.....	38
Figura 2.4 - Mapas bibliométricos de coautoria para autores (A e B), instituições (C e D) e países (E e F) do VOSviewer para publicações sobre determinação do sexo em peixes.....	41
Figura 2.5 - Mapas bibliométricos de coocorrência das palavras-chaves do VOSviewer para publicações sobre determinação do sexo em peixes.....	42
Figura 2.6 - Mapas bibliométricos de citação dos documentos (A e B), fontes (C e D), autores (E e F), instituições (G e H) e países (I e J) do VOSviewer para publicações sobre determinação do sexo em peixes.....	45

Figura 2.7 - Mapas de acoplamento bibliográfico dos documentos (A e B), fontes (C e D), autores (E e F), instituições (G e H) e países (I e J) do VOSviewer para publicações sobre determinação do sexo em peixes.....	47
Figura 2.8 - Análise de cocitação para publicações sobre determinação do sexo em peixes.....	50
Figura 3.1 - Análise de identificação por descendência (IBD) das amostras de todos os produtores estudados.....	73
Figura 3.2 - Projeção de amostras de todos os produtores de tabaqui estudados, considerando dados controlados de qualidade TambaPlus Parentesco (87SNPs).....	74
Figura 3.3 - Análise de identificação por descendência (IBD) de 187 amostras dos sete produtores estudados considerando dados controlados de qualidade Axiom SerraSNP (16.855 SNPs).....	75
Figura 3.4 - PCA de 187 amostras de todos os produtores de tabaqui estudados considerando dados controlados de qualidade Axiom SerraSNP (16.855 SNPs).....	76
Figura 3.5 - Gráfico de Manhattan para análise GWAS. A pontuação de $-\log_{10}P$ para associação de SNPs genotipados é plotada em função da posição do mapa genético.....	77
Figura 4.1 - Representação da metodologia para identificação do potencial gene mestre determinantes do sexo em tabaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	96
Figura 4.2 - (A) Representação do gene <i>znrf2b</i> do <i>Colossoma macropomum</i> localizado no scaffold NW_023494809.1 do NCBI. (B) Alinhamento da sequência da proteína do gene <i>znrf2b</i> do tabaqui com a do humano. As sequências em roxo representam os <i>gaps</i> e o verde indica a presença de identidade.....	100

Figura 4.3 - Alinhamento da sequência dos éxons do gene <i>znrf2b</i> do tabaqui com o do peixe-zebra. As sequências em roxo representam os <i>gaps</i> e o verde indica a presença de identidade.....	101
Figura 4.4 - Representação do gene <i>zgc:158766</i> . (B) Representação do gene <i>LOC118799143</i>	101
Figura 4.5 - Representação dos scaffolds (A) NW_023495214.1 e (B) NW_023494784.1 do <i>Colossoma macropomum</i> encontrados no NCBI.....	102
Figura 4.6 - (A) <i>Amplicons</i> presentes em regiões genômicas específicas presentes apenas em machos em pacu alinhados com (B) genoma de <i>C. macropomum</i> . As sequências em roxo representam os <i>gaps</i> e o verde indica a presença de identidade.	103
Figura 4.7 - Representação dos genes <i>fzdl</i> , <i>znrf2b</i> e <i>nod1</i> do <i>Colossoma macropomum</i> localizado no scaffold NW_023494809.1 do NCBI.....	105
Figura 4.8 - Genótipo de SNPs em indivíduos machos e fêmeas por sequenciamento.....	107
Figura 4.9 - Géis dos produtos de PCR, feitas com os primers CM_13.....	109
Figura 4.10 - Sequência da região genômica do tabaqui em que os primers CM_13.....	109
Figura 4.11 - Géis dos produtos de PCR, feitas com os primers CM_29.....	110
Figura 4.12 - Gráfico de Manhattan para análise GWAS.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Parâmetros bibliométricos utilizados no software VOSviewer para publicações sobre determinação do sexo em peixes.....	34
Tabela 2.2 - Detalhamento dos artigos que tinham como tema determinação ambiental do sexo em peixes.....	39
Tabela 2.3 - Detalhamento dos artigos que tinham como tema determinação genética do sexo em peixes.....	39
Tabela 2.4 - Os 20 principais autores de publicações sobre determinação do sexo em peixes.....	43
Tabela 2.5 - Artigos mais referenciados para publicações sobre determinação do sexo em peixes.....	44
Tabela 2.6 - Principais artigos coocitados para publicações sobre determinação do sexo em peixes.....	50
Tabela 3.1 - Amostras de produtores de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) utilizados no estudo.....	68
Tabela 3.2 - Amostras de produtores de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) selecionadas de acordo com a menor estimativa de parentesco.....	72
Tabela 3.3 - Marcadores significativamente associados ao sexo fenotípico com base na pontuação LOD e utilizando dois conjuntos de dados com 151 e 187 amostras e 21.447 oriundos do AxiomSerraSNP.....	77
Tabela 4.1 – Amostras de produtores de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) utilizados no estudo.....	97

Tabela 5.2 - Sequências dos 32 primers desenhados com descrição das condições da PCR.....104

Tabela 5.3 - Marcadores significativamente associados ao sexo obtidos com o conjunto de 24 amostras e 21.529 SNPs.....111

RESUMO

ANÁLISE GENÔMICA DE REGIÕES ASSOCIADAS A DETERMINAÇÃO DO SEXO DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Nayelle Meyre Lisboa Silva¹, Patrícia Ianella², Alexandre Rodrigues Caetano³

1 Bióloga/ Doutoranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

2 Bióloga/ Doutora – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

3 Zootecnista/ Doutor – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

O objetivo desta tese foi identificar o gene mestre determinante do sexo (MSD) do tambaqui e obter um teste molecular simples, de 100% de acurácia, para identificar o sexo genotípico da espécie. Foram identificados SNPs determinantes do sexo no tambaqui, e a região genômica em que esses marcadores moleculares foram encontrados foi investigada com o sequenciamento dos genes mestres candidatos. Os dados genotípicos de 192 amostras genotipadas com o chip de média densidade Axiom SerraSNP foram utilizados no presente estudo. A associação genômica ampla (GWAS) identificou cinco regiões genômicas associadas ao sexo no tambaqui. Os genótipos de todos os SNPs indicaram um sistema genético XX/XY. O grupo de ligação e a posição desses SNPs foram localizados no genoma referência do tambaqui (NCBI: GCF_904425465.1). Esses marcadores foram encontrados em íntrons dos genes *znrf2b*, *zgc:158766* e *LOC118799143* e em uma região próxima ao gene *bHLH*. Primers foram desenhados em íntrons e éxons dos genes *znrf2b* e *bHLH* e em éxons dos genes *fzdl* e *nod1*, sendo que esses dois últimos genes estavam localizados próximos ao *znrf2b*. PCRs foram feitas com os primers utilizando um subconjunto de amostras de doze machos e doze fêmeas. Esse subconjunto é proveniente dos dados genotípicos das 192 amostras. Foi feita mais uma análise

de GWAS com os SNPs recém-descobertos e com os marcadores do AxiomSerraSNP. Cinco SNPs recém-descobertos estavam associados ao sexo. Os marcadores que apresentaram maior acurácia estavam localizados nos íntrons do gene *znrf2b* e no éxon do *nod1*. O SNP encontrado no *nod1* é responsável por uma variação no códon do RNAm (TGC e TGT), no entanto as duas trincas de bases codificam um mesmo aminoácido, que é a cisteína. Os primers desenhados no éxon do gene *bHLH* amplificaram o fragmento de DNA principalmente nos machos. Os resultados indicam que algum dos genes (*znrf2b*, *bHLH*, *fzd1* ou *nod1*) pode ser o mestre da determinação do sexo em tambaqui, uma vez que não foi possível sequenciar todos os éxons desses genes devido à ausência de amplificação das sequências-alvo (dentre os 26 primers desenhados nos genes, somente 15 amplificaram o fragmento de DNA). Sendo assim, é necessário a realização de estudos complementares que explorem ainda mais essas regiões para compreender melhor os mecanismos de determinação e diferenciação do sexo em tambaqui.

PALAVRAS-CHAVE: GWAS; Piscicultura; SNPs; XX/XY.

ABSTRACT

GENOMIC ANALYSIS OF REGIONS ASSOCIATED WITH SEX DETERMINATION OF TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

The objective of this thesis was to identify the master sex-determining gene (MSD) of tambaqui and to obtain a simple molecular test, with 100% accuracy, to identify the genotypic sex of the species. Sex-determining SNPs were identified in tambaqui, and the genomic region in which these molecular markers were found was investigated by sequencing the candidate master genes. Genotypic data from 192 samples genotyped with the Axiom SerraSNP medium-density chip were used in the present study. Genome-wide association analysis (GWAS) identified five genomic regions associated with sex in tambaqui. The genotypes of all SNPs indicated an XX/XY genetic system. The linkage group and position of these SNPs were in the tambaqui reference genome (NCBI: GCF_904425465.1). These markers were found in introns of the *znrf2b*, *zgc:158766* and *LOC118799143* genes and in a region close to the *bHLH* gene. Primers were designed in introns and exons of the *znrf2b* and *bHLH* genes and in exons of the *fzd1* and *nod1* genes, the latter two genes being located close to *znrf2b*. PCRs were performed with the primers using a subset of samples from twelve males and twelve females. This subset came from the genotypic data of the 192 samples. GWAS analysis was performed with the newly discovered SNPs and with the AxiomSerraSNP markers. Five newly discovered SNPs were associated with sex. The markers that showed the highest accuracy were in the introns of the *znrf2b* gene and in the *nod1* exon. The SNP found in *nod1* is responsible for a variation in the mRNA codon (TGC and TGT); however, the two triplets of bases encode the same amino acid, which is cysteine. The primers designed in the *bHLH* gene exon amplified the DNA fragment mainly in males. The results indicate that one of the genes (*znrf2b*, *bHLH*, *fzd1* or *nod1*) may

be the master of sex determination in tambaqui, since it was not possible to sequence all the exons of these genes due to the lack of amplification of the target sequences (among the 26 primers designed in the genes, only 15 amplified the DNA fragment). Therefore, it is necessary to carry out complementary studies that further explore these regions to better understand the mechanisms of sex determination and differentiation in tambaqui.

KEYWORDS: Fish farming; GWAS; SNPs; XX/XY.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

Os peixes são encontrados em diversos habitats e representam o grupo mais diversificado de vertebrados, incluindo mais de 36.000 espécies (*Eschmeyer's Catalog of Fishes*, 2024). Essa diversificação, explicada por se tratar de um grupo polifilético (que não compartilham um único ancestral comum) permite que todos os tipos de estratégias reprodutivas sejam encontrados nesse grupo. Da mesma forma, os peixes apresentam múltiplos sistemas de determinação sexual. De modo geral, determinação do sexo genética (GSD – *Genetic Sexual Determination*) e/ou determinação ambiental do sexo (ESD – *Environmental Sexual Determination*) e desenvolvimento gonadal gonocorístico ou hermafrodita (Devlin & Nagahama, 2022). Os mecanismos de determinação genética dos peixes geralmente são definidos por um gene crítico localizado em um cromossomo sexual ou por múltiplos genes situados tanto em autossomos como em cromossomos sexuais. Dentre os principais sistemas de determinação do sexo, encontram-se o sistema XX/XY (fêmea/macho) e o ZZ/ZW (macho/fêmea), além das suas variantes, sendo que o heteromorfismo do cromossomo sexual não é frequentemente observado (Rajendiran et al., 2021).

Genes mestres determinante do sexo (MSD - *Master Sex Determination*) já foram identificados em várias espécies como o gene *Dmy* em medaka (*Oryzias latipes*) (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002), o *Amhy* em peixe rei (*Odontesthes hatcheri*) (Hattori et al., 2012) o *gsdfY* em *Oryzias luzonensis* (Myosho et al., 2012), o *Amhr2* em *Takifugu rubripes* (Kamiya et al., 2012), o *Sdy* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Yano et al., 2012), o *Sox3Y* em *Oryzias dancena* (Takehana et al., 2014), o *gdf6Y* em *Nothobranchius furzeri* (Reichwald et al., 2015), o *dmrt1* em *Cynoglossus semilaevis* (Cui et al., 2017) e o *Hsd17b1* em *Seriola* (Koyama et al., 2019). Outras espécies apresentam determinação genética poligênica (PSD – *Polygenic Sex Determination*), onde vários locus ou alelos, que segregam de forma

independente, determinam o sexo dos indivíduos. Alguns exemplos são o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) e o peixe-zebra (*Danio rerio*) (El-Zaeem et al., 2024; Li et al., 2024).

A determinação ambiental do sexo ocorre quando fatores ambientais, como hormônios, temperatura, pH, densidade e hipóxia, interferem no destino sexual dos indivíduos (Kijas et al., 2018). A temperatura é o fator ambiental mais estudado, sendo que 77 espécies de teleósteos estudados apresentam determinação do sexo dependente da temperatura (Kitano et al., 2023). No peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*), por exemplo, a alta temperatura causa viés para o sexo masculino (Fresno et al., 2023) e, em poucas espécies, como a *Menidia menidia*, uma transição de machos para fêmeas ocorre nesses casos (Hancock et al., 2023).

Compreender a base do desenvolvimento sexual de peixes é importante por vários motivos: 1) A diversidade da biologia e ecologia desses animais permite a realização de estudos acadêmicos e aplicados sobre a determinação do sexo de vertebrados em geral (Pennell et al., 2018); 2) Na ESD, a variável ambiental mais bem caracterizada (temperatura) tem levantado um intenso debate sobre as consequências do aquecimento global (Consuegra & Rodríguez López, 2016; Research, 2021; Valenzuela et al., 2019); e 3) A piscicultura depende em grande parte da reprodução para desenvolver técnicas que incluem a produção de populações monossexuais devido à existência de dimorfismo sexual de crescimento, e como mecanismo para controle de reprodução indesejada nos sistemas de engorda (He et al., 2017; Taslima et al., 2020; Wang et al., 2023; Wang et al., 2019).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie nativa economicamente importante que exibe um forte dimorfismo sexual em favor das fêmeas, as quais após a maturação sexual são maiores e mais pesadas que os machos da mesma idade (Almeida et al., 2016). O crescimento superior observado nas fêmeas tem potencial para ser explorado comercialmente, em sistemas de produção monosexo, onde populações 100% fêmeas poderão ser geradas com cruzamentos dirigidos de peixes que passaram por reversão sexual com hormônios (Ex: fêmeas XX, tratadas com testosterona para se tornarem machos fenotípicos, cruzadas com fêmeas normais). No entanto, para que se possa aplicar essa estratégia, é necessário que se desenvolva um teste molecular simples, de alta acurácia, para identificar o sexo genotípico de peixes submetidos a tratamentos hormonais (Varela et al., 2021).

Até o momento, sabe-se algumas informações a respeito da determinação e diferenciação do sexo do tambaqui. O *C. macropomum* é uma espécie gonocórica, apresenta sistema heterogamético masculino (XX/XY) e não tem sensibilidade sexual a diferentes temperaturas e pHs (Reis et al., 2024; Varela et al., 2021). Ainda não foi identificado o gene

mestre (MDS) na espécie. A diferenciação das gônadas ocorre com a via *Wnt/β-catenina* direcionando o processo de diferenciação ovariana, assim como os genes *fox* e *fst*, enquanto as vias antagônicas (*gsk3b*, *wt1* e *fgfr2*), o *sox9* e os genes para síntese de andrógenos indicam diferenciação masculina (Lobo et al., 2020). O neurotranscriptoma com caracterização e expressão diferencial entre machos e fêmeas indicou que 63 genes foram regulados positivamente para fêmeas e 28 para machos (Miranda et al., 2024).

Pode-se notar que existe um conhecimento acumulado sobre a determinação do sexo em espécies de teleósteos no geral, no entanto, as pesquisas sobre os mecanismos de determinação sexual e diferenciação gonadal do tambaqui são escassas e fragmentadas. O conhecimento acumulado e essas lacunas podem ser avaliados em estudos de análises bibliométricas, uma vez que essa técnica permite analisar, resumir, agrupar e comentar os resultados das pesquisas. É possível identificar problemas existentes em um determinado período, encontrar lacunas na abordagem dos conteúdos e propor soluções (McManus et al., 2023). Nas análises bibliométricas são utilizadas técnicas avaliativas (medidas de produtividade e de impacto, como artigos acadêmicos publicados por ano, número de artigos por autor e número de citações) e técnicas relacionais (análises de cocitação, coautoria, copalavras e acoplamento bibliográfico) (Koseoglu et al., 2016).

Nesse contexto, o objetivo geral da tese foi identificar o MSD do tambaqui e obter um teste molecular simples, de 100% de acurácia, para identificar o sexo genotípico da espécie. A tese é composta por cinco capítulos. O **Capítulo I** traz a introdução geral e a revisão bibliográfica. No **Capítulo II** foi feito o mapeamento bibliográfico de citação, coocorrência de palavras-chave, cocitação e acoplamento bibliográfico para determinação do sexo de várias espécies de peixes, dentre elas o *C. macropomum*. No **Capítulo III** foi realizado um estudo que identificou marcadores genéticos determinantes do sexo no tambaqui. No **Capítulo IV** a região genômica em que foram encontrados os SNPs associados ao sexo foi avaliada para identificação do possível gene mestre determinante do sexo, em seguida foi feito com o sequenciamento dos éxons dos genes candidatos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Compreender os mecanismos determinantes do sexo e desenvolver ensaios precisos para atribuir o sexo genético do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar regiões sexo-específicas e/ou Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) presentes em regiões genômicas determinantes do sexo;
- Identificar o sistema de determinação genético e o gene mestre determinante do sexo (MSD - *Master Sex Determining*) no tambaqui;
- Desenvolver uma ferramenta molecular de alta acurácia que identifique o sexo genético no *C. macropomum*.

1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Descrição Biológica do tambaqui (*Colossoma macropomum*)

C. macropomum (Cuvier, 1816) é uma espécie pertencente à classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Serrasalminae. É considerado o segundo maior peixe com escamas da Amazônia, podendo atingir até um metro de comprimento e 30kg de peso. Trata-se de um peixe neotropical (faixa de temperatura preferida 25-34°C) que migra entre diferentes massas de água doce ao longo do seu ciclo de vida. Os adultos se alimentam em florestas inundadas (dieta frugívoro-onívoro) durante a estação de cheia, e com a seca, os peixes maduros sexualmente (3 a 4 anos) migram para desovar em corredeiras. As larvas, pós-larvas e juvenis vão para regiões ricas em nutrientes até chegarem a fase reprodutiva e se deslocarem para desova (Hilsdorf et al., 2022).

A espécie é nativa da bacia Amazônica, da Orinoco e de seus afluentes e pode viver em rios de águas brancas e negras. Além do Brasil, o tambaqui também é encontrado na Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia (Figura 1.1) (Val & Oliveira, 2021).



Figura 1.1: Distribuição natural do tambaqui (*Colossoma macropomum*) nas bacias do rio Amazonas e Orinoco. Fonte: (Val & Oliveira, 2021).

Em relação a morfologia, o tambaqui apresenta modificações no formato do corpo ao longo do seu desenvolvimento, sendo ovoide na fase inicial (Figura 1.2A), romboide na fase pré-adulta (Figura 1.2B) e alongado quando adulto (Figura 1.2C). Além disso, existe uma variação na coloração. Indivíduos com menos de 10cm são prateados e tem uma mancha escura arredonda no meio do corpo (Figura 1.2D), enquanto os juvenis e adultos geralmente são pardos na metade superior e preta na metade inferior do corpo, no entanto podem variar para mais clara ou mais escura dependendo da cor da água onde vivem (Figura 1.2E) (Val & Oliveira, 2021).

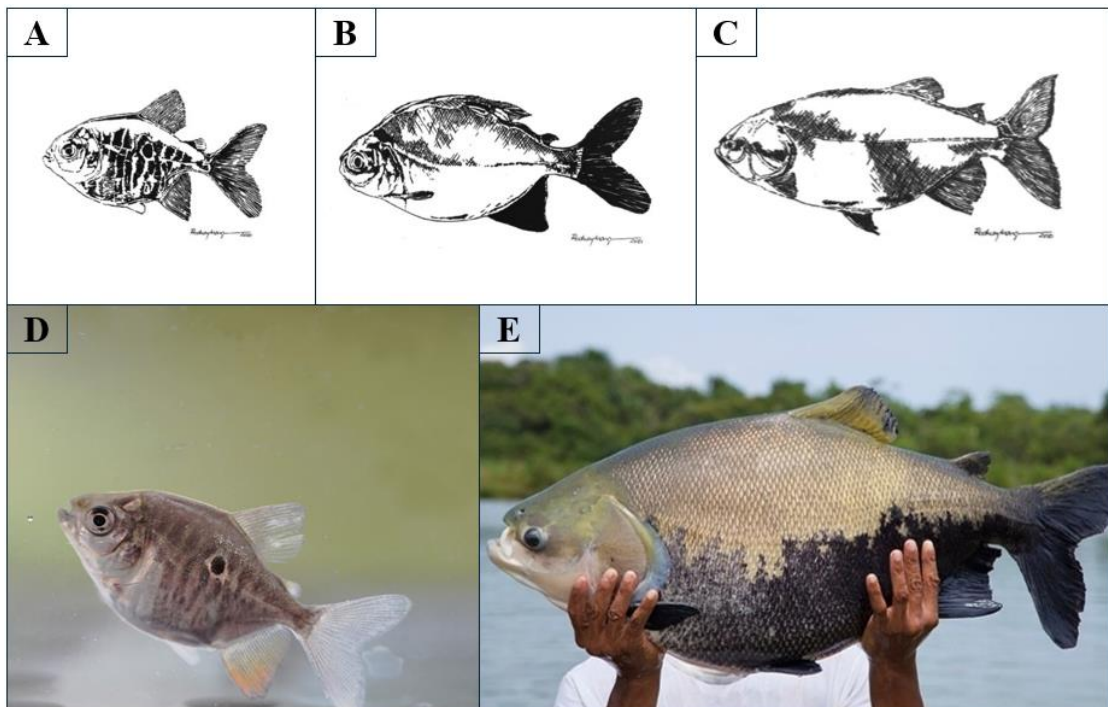


Figura 1.2: Formato e coloração do corpo do tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo de seu desenvolvimento. (A) Fase inicial, ovoide; (B) fase pré-adulta, romboide; (C) adulto, alongado; (D) indivíduos com menos de 10cm são prateados e com uma mancha escura arredonda no meio do corpo; (E) os juvenis e adultos geralmente são pardos na metade superior e preta na metade inferior do corpo. Fontes: adaptado de (Val & Oliveira, 2021) e (Aquaculture Brasil, 2024)

Outras características interessantes encontradas na espécie são: dimorfismo sexual em que as fêmeas crescem mais que os machos; presença de lábios grossos; boca prognata pequena e forte com dentes molariformes; ausência de espinha pré-dorsal; nadadeira adiposa curta com raios na extremidade; e rastros branquiais longos e numerosos. O formato

dos dentes permite que o animal se alimente de frutos e sementes (mais de 130 espécies) que caem na água durante o período de cheia dos rios e os rastros branquiais possibilitam a filtragem de pequenos organismos, como o zooplâncton, que flutuam na água. Uma adaptação morfológica marcante do tambaqui está relacionada às mudanças das concentrações de oxigênio na água. Quando exposto à hipoxia, o peixe expande o lábio inferior para facilitar a captura da fina camada superficial de oxigênio presente na coluna d'água (Moraes & O'sullivan, 2017).

1.3.2 Produção do tambaqui

Os primeiros registros de domesticação e cultivo ocorreram na década de 1930 (Ihering, 1937). Algumas décadas depois, em 1980, aconteceram alguns eventos relevantes para a espécie como: o *workshop* dedicado à piscicultura do tambaqui; o desenvolvimento de técnicas artificiais de propagação e incubação; e a disponibilidade de alevinos em uma base comercial regular (Hilsdorf et al., 2022). Nos anos seguintes houve um grande aumento na produção do tambaqui devido às suas características biológicas e zootécnicas atrativas, como: facilidade de produção de alevinos; hábito alimentar onívoro e fácil aceitação de rações aquáticas; rápido crescimento em cativeiro (2–3 kg ano); boa adaptação a altas densidades populacionais em condições de engorda; resistência a baixos níveis de oxigênio e má qualidade da água; resistência a doenças; e grande aceitação do mercado consumidor (Hilsdorf et al., 2022). Além de ser uma espécie relevante para aquicultura, o *C. macropomum* é importante na Amazônia devido a dieta local. Segundo a Secretaria de Pesca e Aquicultura, Manaus consome cerca de 400 mil kg de tambaqui por ano (Fernandes et al., 2022).

Em 2022, a produção dessa espécie foi maior que 109 toneladas (IBGE, 2024), sendo que a região Norte foi a maior produtora, seguida pelo Nordeste e Centro Oeste. Além de ser produzido no Brasil, o tambaqui foi introduzido, intencionalmente por pisciculturas ou por acidente, em numerosos países da América Latina, nos Estados Unidos da América e em vários países da Ásia, incluindo China, Indonésia, Malásia, Mianmar, Vietnã, Tailândia e Singapura (Amanajás et al., 2018).

Em relação aos sistemas de produção, o tambaqui é cultivado em sistemas extensivos, semi-intensivos e intensivos. O primeiro sistema costuma ser instalado em represas, lagos, lagoas e açudes, não há fornecimento de ração balanceada e é destinado para consumo das próprias famílias ou para fins de recreação. O sistema semi-intensivo tem como foco a maximização da produção, sendo que, geralmente, é implementado em barragens, tanques ou

viveiros escavados no terreno. Além disso, os criadores fornecem alimentos vivos (fitoplâncton e zooplâncton) e ração industrial aos peixes. Já o sistema intensivo tem a finalidade de obter alta produtividade com densidade de estocagem elevada e permite a utilização de qualquer tipo de massa de água para fins de piscicultura (Hilsdorf et al., 2022).

A implementação de um sistema de produção monossexo é interessante para o tambaqui, uma vez que existe dimorfismo sexual em que o crescimento das fêmeas é superior. Populações 100% fêmeas poderiam ser geradas com cruzamentos dirigidos de peixes que passaram por reversão sexual com hormônios (Piferrer, 2001) (Figura 1.3). No entanto, para que se possa aplicar essa estratégia, é necessário compreender os mecanismos de determinação do sexo na espécie.

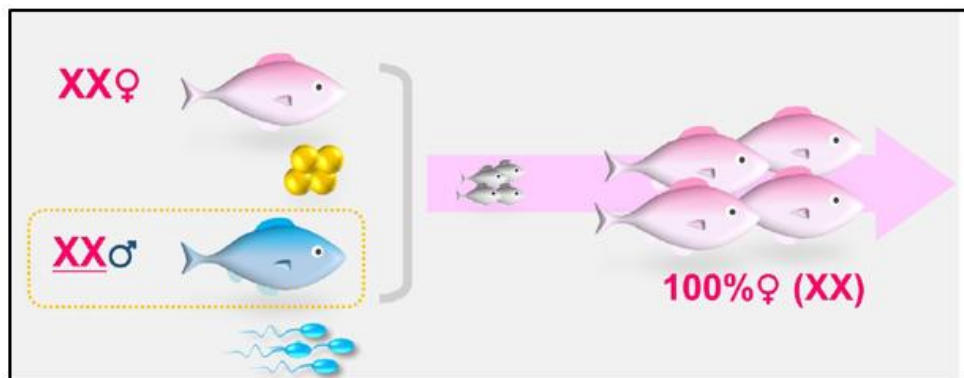


Figura 1.3: Representação esquemática do processo de produção de progênie 100% fêmeas usando macho com sexo revertido (XX) considerando sistema genético XX/XY. Fonte: adaptado de Fernandino & Hattori (2019).

1.3.3 Determinação e diferenciação do sexo em teleósteos

Os mecanismos de determinação do sexo (SD – *Sex Determination*) dos teleósteos podem ser complexos ocorrendo determinação genética do sexo (GSD – *Genetic Sex Determination*), determinação ambiental do sexo (ESD – *Environmental Sex Determination*), ou uma combinação de ambas. Os sistemas GSD são governados principalmente por fatores genéticos, podendo ser cromossômicos ou poligênicos (PSD – *Polygenic Sex Determination*) envolvendo vários genes ou vários cromossomos sexuais. Já os sistemas ESD são controlados por efeitos ambientais abióticos como temperatura, pH, hipóxia, dentre outros e efeitos bióticos (interações sociais e crescimento) (Figura 1.4) (Devlin & Nagahama, 2022).

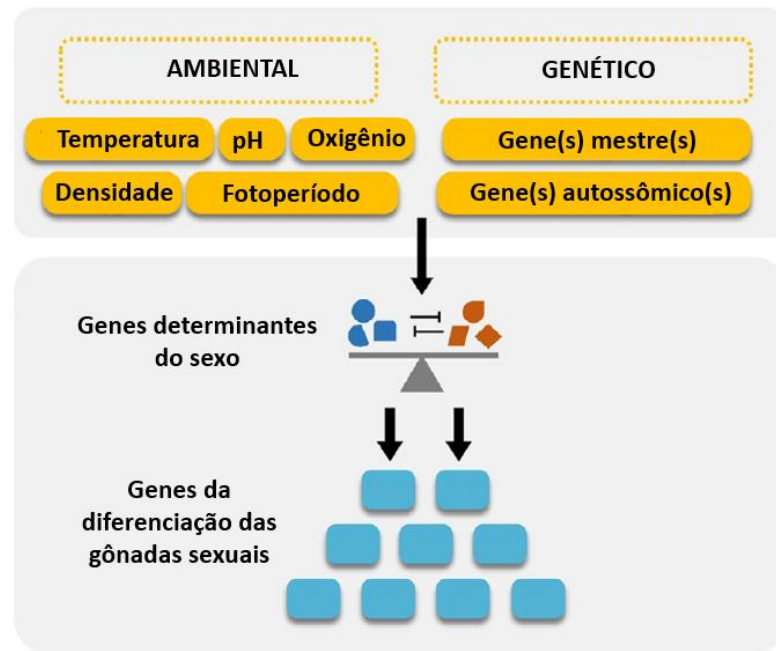


Figura 1.4: Esquema demonstrando os principais mecanismos de determinação e diferenciação do sexo em peixes. Fonte: adaptado de Fernandino & Hattori (2019).

1.3.3.1 Determinação genética do sexo

Entre as espécies de peixes diferentes abordagens são utilizadas para determinação genética do sexo, sendo que os principais sistemas genéticos encontrados são heterogamético masculino (XX/XY) e heterogamético feminino (ZZ/ZW) (Rajendiran et al., 2021). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por exemplo, é um teleósteo com sistema de determinação do sexo XX/XY, enquanto o linguado chinês (*Cynoglossus semilaevis*) tem o sistema ZZ/ZW (Cáceres et al., 2019; Wang et al., 2019). Nesses exemplos ocorre a determinação cromossômica do sexo, onde somente um locus genético atua com o interruptor mestre. Outras espécies como o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) e o peixe-zebra (*Danio rerio*) apresentam determinação poligênica, onde vários locus ou alelos, que segregam de forma independente, determinam o sexo do indivíduo (El-Zaeem et al., 2024; Li et al., 2024).

Tanto na determinação cromossômica do sexo quanto na poligênica, existe um gatilho genético inicial com a atuação de um (GSD) ou mais genes (PSD). Em 1990, foi feita a primeira descoberta de um gene mestre determinante do sexo (MSD, *Master Sex-Determining*) em vertebrados, o *Sry* (Sinclair et al., 1990). Este gene está presente no cromossomo Y e é responsável por iniciar o desenvolvimento testicular em mamíferos. Alguns anos depois, em 2002, foi identificado o *Dmy* em medaka (*Oryzias latipes*) (Matsuda et al., 2002; Nanda et al.,

2002). O *Dmy* é uma duplicata do gene autossômico *dmrt1*, assim como o *Sry* é derivado de uma duplicação de *Sox*. Essas semelhanças sugeriram que o *Dmy* e o *Sry* têm as mesmas funções. O segundo gene MSD encontrado em teleósteos foi o *Amhy* (Hormônio Anti-Mülleriano ligado ao Y) que é uma duplicação do gene autossômico *amh* (Hattori et al., 2012; Li et al., 2024). O *gsdfY* é o regulador mestre da diferenciação sexual em *Oryzias luzonensis*. Apesar de se tratar de uma espécie pertencente ao mesmo gênero que *O. latipes*, foram encontrados diferentes genes MSD entre as duas espécies, sendo que em *O. latipes* o *gsdf* está localizado em um autossomo, e, em *O. luzonensis*, este mesmo gene foi encontrado no cromossomo Y (Myosho et al., 2012). Outros genes mestres determinantes do sexo foram descobertos ao longo dos anos como o *Amhr2* em *Takifugu rubripes* (Kamiya et al., 2012), *Sdy* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Yano et al., 2012), *Sox3Y* em *Oryzias dancena* (Takehana et al., 2014), *gdf6Y* em *Nothobranchius furzeri* (Reichwald et al., 2015), *dmrt1* em *Cynoglossus semilaevis* (Cui et al., 2017) e *Hsd17b1* em *Seriola* (Koyama et al., 2019). No total, foram descobertos genes MSD em 114 espécies de teleósteos (Kitano et al., 2023).

Dentre os genes citados, quatro deles (*Sry*, *Dmy*, *Sox3Y* e *dmrt1*) são fatores de transcrição, ou seja, são proteínas que interagem com promotores de outros genes específicos para ativar os processos de transcrição. Outros quatro genes (*Amhy*, *gsdfY*, *Amhr2* e *gdf6Y*) pertencem à via de sinalização TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta) que é uma proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções em várias células (Pan et al., 2021).

1.3.3.2 Determinação ambiental do sexo

Fatores ambientais como temperatura, densidade, hipóxia, pH e interações sociais, podem influenciar na determinação e na diferenciação sexual dos peixes. A temperatura é o fator ambiental que mais influencia o sexo, sendo que esse processo é chamado de determinação do sexo dependente da temperatura (TSD, *Temperature Sex Determination*). TSD foi relatado em 77 espécies de teleósteos (Kitano et al., 2023). De forma geral, existem duas formas de a temperatura interferir na determinação. A primeira delas é interagindo com GSD, como ocorre com o bagre africano (*Clarias gariepinus*) e a tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Santi et al. (2019) e Kobayashi et al. (2008) notaram que a alta temperatura induziu a masculinização em progênies dessas espécies devido ao aumento da expressão do gene MSD *Dmrt1*. A temperatura também influencia a determinação do sexo por meio de sua atuação independente causando alterações epigenéticas em genes relevantes para a diferenciação do sexo. Navarro et

al. (2011) e Wang et al. (2017) verificaram que a alta temperatura aumentou os níveis de metilação do promotor da aromatase gonadal (*cyp191a* - enzima que converte androgênios (hormônios masculinos) em estrogênios (hormônios femininos), que são essenciais para o desenvolvimento ovariano em todos os vertebrados não mamíferos) e suprimiu sua expressão, resultando em masculinização induzida de vários indivíduos. Como pode-se notar o mais observado nos teleósteos estudados é o maior número de machos em temperaturas mais altas.

A densidade e a hipóxia são outros fatores ambientais importantes na determinação do sexo em peixes. A hipóxia está diretamente relacionada com maior densidade populacional dos cativeiros. O peixe rei (*Odontesthes bonariensis*), por exemplo, apresenta reversão sexual de fêmea para macho em ambientes com alta densidade populacional (García-Cruz et al., 2020). Além disso, Robertson et al. (2014) notaram que a exposição de embriões de peixe-zebra à hipóxia ocasionou o aumento de machos na população. Tanto a hipóxia quanto a densidade causam estresse nos peixes resultando em expressões mais elevadas de cortisona e do andrógeno *11-cetotestosterona* (*11-KT*) e um aumento da frequência de masculinização (Rajendiran et al., 2021).

O pH é outro fator ambiental relevante. Espécies como *Apistogramma caetei* (Rajendiran et al., 2021), *Pelvicachromis pulcher* (Reddon & Hurd, 2013), *Pelvicachromis subocellatus* e *Pelvicachromis taeniatus* (Baroiller et al., 2009) apresentaram população masculina monossexual ou proporção sexual desequilibrada com maior número de machos em pH ácido (<7), enquanto no pH neutro ou básico (≥ 7) ocorre o aumento das proporções de fêmeas.

Além dos efeitos ambientais abióticos abordados, fatores sociais no ambiente podem interferir na determinação do sexo (BSD - *Behavioral Sex Determination*). Francis & Barlow (1993) realizaram um estudo com *Amphilophus citrinellus* em que os alevinos pequenos se diferenciam como fêmeas e os maiores como machos. Pesquisas posteriores não apoiaram essa hipótese, uma vez que os peixes capturados na natureza não tiveram a determinação do sexo relacionada ao tamanho (Oldfield, 2009; Oldfield et al., 2006). Outra pesquisa também ganhou destaque no quesito comportamental em que os indivíduos isolados da espécie peixe paraíso (*Macropodus opercularis*) tornaram-se machos (Baroiller, D'Cotta, & Saillant, 2009).

1.3.3.3 Diferenciação sexual gonadal em teleósteos

A diferenciação sexual gonadal é o processo pelo qual uma gônada indiferenciada se desenvolve como testículo ou ovário após o sexo ter sido determinado (Mei

& Gui, 2015). Esse desenvolvimento gonadal pode ser gonocorístico ou hermafrodita. Os principais tipos gonocorismo é o diferenciado e o indiferenciado. No primeiro, o desenvolvimento gonadal ocorre a partir de uma gônada primordial para ovário ou testículo. Enquanto no gonocorismo indiferenciado, as gônadas se desenvolvem inicialmente como ovários em todos os indivíduos, e, em aproximadamente metade da população, o tecido ovariano se degenera para formação de testículos. O hermafroditismo pode ser síncrono (ocorre a produção de gametas masculinos e femininos ao mesmo tempo) ou sequencial (os peixes produzem primeiro um tipo de gameta e em seguida invertem o sexo para produzir outro tipo). Quando os indivíduos amadurecem primeiro como machos, ocorre o hermafroditismo sequencial protândrico, caso o peixe se desenvolva primeiro como fêmea ocorre o hermafroditismo protogínico (Renn & Hurd, 2021).

Os esteroides sexuais desempenham papéis importante na diferenciação sexual gonadal de peixes. Os estrogênios são essenciais para a diferenciação ovariana, enquanto os andrógenos são necessários para o desenvolvimento testicular. Os genes envolvidos na via de esteroides sexuais mais conhecidos são: a aromatase gonadal (*cyp19a1a*) que está relacionada com as vias de síntese de estrogênio; e a 11- β hidroxisteróide desidrogenase tipo 2b (*hsd11b2*) que está relacionado com a via androgênica (Fernandino & Hattori, 2019). *Cyp19a1a* é extremamente relevante para a diferenciação gonadal em várias espécies, uma vez que sua alta expressão e/ou atividade resulta na formação das gônadas femininas, enquanto a sua inibição induz o desenvolvimento de gônadas masculinas. O gene *hsd11b2* faz parte da principal biossíntese de andrógenos, a 11-cetotesterona (11-K), enquanto a mutação do gene *cyp19a1a* reduz a produção de estrogênio, consequentemente aumentando a produção de 11-K (Zhou et al., 2021). Devido a isso, várias pesquisas tiveram como foco compreender a expressão do gene *cyp19a1a* na diferenciação sexual gonadal de peixes (Cai et al., 2022; El-Zaeem et al., 2024; Guo et al., 2021; Huang et al., 2023).

1.3.3.4 Desenvolvimento de ferramentas para identificação de marcadores determinantes do sexo em teleósteos

Várias espécies de teleósteos apresentam dimorfismo sexual, como tamanho e taxa de crescimento. Em robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Faggion et al., 2021) e em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Akbarialmajough et al., 2020), por exemplo, as fêmeas atingem a maturidade sexual alguns meses depois dos machos e com isso crescem mais rápido, enquanto no atum do pacífico (*Thunnus orientalis*) (Shimose et al., 2016) e no bagre do canal (*Ictalurus*

punctatus) (Liao et al., 2023) o crescimento é maior nos machos. A compreensão dos mecanismos de determinação do sexo e o desenvolvimento de um método de identificação sexual rápido e econômico para espécies com dimorfismo sexual são importantes para realização de reprodução com controle sexual, para a melhoria da eficiência da seleção de reprodutores e para o cultivo monossexuado (Xing et al., 2021).

Várias abordagens moleculares foram utilizadas para identificar marcadores sexuais em peixes, como DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*), Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites com repetições de sequência simples (SSR, *Simple Sequence Repeats*). Com um custo cada vez mais acessível, as tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (NGS, *Next Generation Sequencing*) tem sido amplamente aplicadas, em diferentes abordagens, para realização de estudos genômicos. Diferentes técnicas de NGS foram utilizadas para descobrir marcadores ligados ao sexo como o sequenciamento de DNA associado ao local de restrição (RAD-seq, *Restriction Site Associated DNA Markers*), o mapeamento de locus de características quantitativas (QTL, *Quantitative Trait Locus*) e o sequenciamento do genoma completo (Gong et al., 2022).

Muitos são os exemplos de estudos que utilizaram estas diferentes abordagens moleculares para identificar marcadores sexo-específicos em diferentes espécies de peixes. Chen et al. (2007) descobriram um marcador AFLP específico em fêmeas no linguado chinês (*Cynoglossus semilaevis*) e desenvolveram um método de PCR simples para identificar o sexo genético da espécie, sendo que os produtos de PCR de 59 fêmeas produziram uma banda específica com cerca de 350 pb. Chen et al. (2009) encontraram uma região sexo específica em machos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) com 909 pb utilizando RAPD, e Galindo et al. (2011) identificaram três locus microssatélites que estavam relacionados ao sexo feminino no alabote do Pacífico (*Hipoglossus stenolepis*), uma vez que a atribuição genética identificou com sucesso o sexo de 92% dos indivíduos.

Estudos utilizando metodologia mais atuais e incorporando tecnologias NGS vem sendo amplamente utilizados para a mesma finalidade. Marcadores específicos do sexo também foram identificados em algumas espécies usando sequenciamento de DNA RAD-Seq. O genoma do hapuku (*Polyprion oxygeneios*), por exemplo, foi sequenciado com dupla digestão de DNA associado ao local de restrição (ddRAD). Foi possível gerar um mapa de ligação sexual de 35 grupos de ligação com base em 1575 marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Em seguida, foi identificado um locus determinante do sexo no grupo

de ligação 14 que indicou o sistema de determinação sexual da espécie como XX/XY. Por fim, dois SNPs determinantes do sexo foram utilizados para desenvolver ensaios de PCR específicos para os alelos observados (Brown et al., 2016).

Pan et al. (2022) basearam-se nos resultados de mapeamento de QTL relacionados ao sexo para identificar 13 SNPs específicos de machos que estavam localizados em éxons do gene *zbtb38* do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*). Além disso, estudos realizados com outras espécies utilizaram o sequenciamento do genoma completo para identificar marcadores específicos do sexo no atum do pacífico (*T. orientalis*) (Suda et al., 2019) e no peixe do gelo (*Protosalanx hyalocranius*) (Xing et al., 2021). Já no salmão do Atlântico (*Salmo salar*), foi utilizado um painel de SNPs com 220 K para identificar os cromossomos sexuais, regiões candidatas e genes associados ao desenvolvimento do sexo (Gabián et al., 2019).

Além das abordagens moleculares citadas, vários estudos fizeram sequenciamento do genoma completo para identificar regiões associadas ao sexo em peixes, fazendo uso das últimas tecnologias de NGS disponibilizadas mais recentemente. Li et al. (2020) por exemplo, sequenciaram os genomas inteiros de 20 machos e 20 fêmeas de *Protosalanx hyalocranius* e fizeram análise de associação genômica ampla (GWAS) para descobrir o sistema de determinação sexual ZZ/ZW e o possível gene determinante do sexo (GALNT) na espécie. Essa mesma abordagem de sequenciamento foi usada para confirmar o sistema XX/XY, identificar o locus sexual no cromossomo 7 e encontrar marcadores genéticos específicos para machos no achigã (*Micropterus Salmoides L.*) (Wen et al. 2022). A partir do ressequenciamento do genoma completo (WGS re-seq) do peixe-espinho (*Spinibarbus hollandi*) foram obtidas 20 sequencias candidatas específicas de sexo. Além disso, seis marcadores específicos de machos foram desenvolvidos com precisão de 100% na identificação sexual dos indivíduos (Huang et al., 2024).

1.3.3.5 Determinação e diferenciação do sexo em tambaqui

Nos últimos anos alguns artigos sobre estudos genéticos do tambaqui foram publicados. Isso foi essencial para a realização de pesquisas iniciais sobre determinação e diferenciação do sexo na espécie. Hashimoto et al. (2014) fizeram análises citogenéticas e identificaram $2n = 54$ cromossomos, e assim como foi observado na maioria das espécies de teleósteos, nenhum heteromorfismo foi encontrado nos cromossomos sexuais. Nunes et al.

(2017) e Hilsdorf et al. (2021) sequenciaram o genoma do tambaqui e identificaram grandes conjuntos de SNPs que, logo em seguida, foram disponibilizadas no chip comercial Axiom SerraSNP, um painel com 29.575 SNPs de *C. macropomum* e 29.612 SNPs de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Sabem-se poucas informações a respeito dos mecanismos de determinação e diferenciação genética do tambaqui. Varela et al. (2021) sequenciou o DNA do *C. macropomum* utilizando a técnica ddRAD, gerando a partir destes dados, um mapa genético com 27 grupos de ligação usando 14.805 SNPs e identificando marcados ligados ao sexo na espécie. O mapeamento da região associada ao sexo em único cromossomo sugere um sistema heterogamético masculino XX/XY. Quatro SNPs mais informativos ligados ao sexo e identificados no cromossomo 26 foram validados em indivíduos fenotipicamente sexados com acurácia variando entre 90 e 96%. No entanto, até o momento, nenhum estudo foi capaz de identificar o gene MSD do tambaqui.

A diferenciação sexual do tambaqui ocorre em juvenis de até 44mm de comprimento total, quando os órgãos sexuais podem ser identificados em estudos histológicos (Lobo et al., 2020). A via *Wnt/β-catenina* direciona o processo de diferenciação ovariana no tambaqui, assim como os genes *fox* e *fst*, enquanto vias antagônicas (*gsk3b*, *wt1* e *fgfr2*), *sox9* e genes para síntese de andrógenos indicam diferenciação masculina (Lobo et al., 2020). Outra constatação interessante de pesquisas do transcriptoma das gônadas, é que o gene *amh* foi mais expresso em fêmeas do que em machos, o oposto do que foi notado em outras espécies de teleósteos (Lobo et al., 2020). A expressão gênica da aromatase gonadal (*cyp19a1a*) também foi avaliada, no entanto, não foi evidenciado que esse gene está relacionado com a diferenciação das gônadas do tambaqui (Paixão et al., 2022). Recentemente, Miranda et al. (2024) geraram o neurotranscriptoma do tambaqui com caracterização e expressão diferencial entre machos e fêmeas. Observaram que 91 transcritos foram expressos diferencialmente, sendo que 63 foram regulados positivamente em fêmeas e 28 em machos. Os genes candidatos identificados estão relacionados com a diferenciação sexual em outras espécies (por exemplo, *SAFB*) e resposta imune (por exemplo, *SLC2A6*, *AHNAK*, *NLRC3*, *NLRP3* e *IgC MHC I alfa3*) (Miranda et al., 2024).

Alguns estudos avaliaram se ocorre influência de fatores ambientais na determinação do sexo do tambaqui. Silva & Ossullivan (2015) distribuíram ovos fecundados em três tanques com temperatura diferentes (26, 28 e 30°C), em seguida sacrificaram os indivíduos, examinaram as suas gônadas e concluíram que não houve mudança na proporção

sexual dos peixes. Reis et al. (2024) verificaram que as temperaturas 26, 28 e 31 °C não alteram a expressão dos genes envolvidos na diferenciação das gônadas femininas (*foxl2*) e masculinas (*ar* e *wt1*). Além disso, Morais et al. (2018) investigaram se há influência do pH (6,7, 7,5 e 8,2) da água na determinação do sexo e concluíram que esse fator ambiental não interfere na razão sexual do tambaqui.

Os achados da literatura indicam que ainda não está claro quais variantes causadoras putativas específicas estão envolvidas na regulação do sexo no tambaqui, nem o gene MSD responsável por determinar o sexo da espécie. Com isso, é necessário a realização de estudos para compreender melhor os mecanismos de determinação e diferenciação do sexo da espécie.

REFERÊNCIAS

- Akbarialmajough, T., Manaffar, R., Najdegerami, E. H., & Bossier, P. (2020). New insight into the diversity of exon and intron 5 regions of *Oncorhynchus mykiss* growth hormone (GH) gene: sexual dimorphism in the GH gene. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 12, Issue 1, pp. 254–260). Wiley-Blackwell.
- Almeida, F. L., Lopes, J. S., Crescencio, R., Izel, A. C. U., Chagas, E. C., & Boijink, C. (2016). Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, *452*, 224–232.
- Amanajás, R. D., Silva, J. M., & Val, A. L. (2018). Growing in the dark warmth: The case of Amazonian fish *Colossoma macropomum*. *Frontiers in Marine Science*, *5*(DEC).
- Aquaculture Brasil. (n.d.). *Conheça dois peixes híbridos criados a partir do tambaqui da Amazônia*. 2022. Retrieved April 24, 2024, from <https://www.aquaculturebrasil.com/noticia/275/conheca-dois-peixes-hibridos-criados-a-partir-do-tambaqui-da-amazonia>
- Baroiller, J. F., D’Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., & Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, *153*(1), 30–38.
- Baroiller, J. F., D’Cotta, H., & Saillant, E. (2009). Environmental effects on fish sex determination and differentiation. In *Sexual Development* (Vol. 3, Issues 2–3, pp. 118–135).
- Brown, J. K., Taggart, J. B., Bekaert, M., Wehner, S., Palaiokostas, C., Setiawan, A. N., Symonds, J. E., & Penman, D. J. (2016). Mapping the sex determination locus in the hapuku (*Polyprion oxygeneios*) using ddRAD sequencing. *BMC Genomics*, *17*(1).
- Cáceres, G., López, M. E., Cádiz, M. I., Yoshida, G. M., Jedlicki, A., Palma-Véjares, R., Travisany, D., Díaz-Domínguez, D., Maass, A., Lhorente, J. P., Soto, J., Salas, D., & Yáñez, J. M. (2019). Fine Mapping Using Whole-Genome Sequencing Confirms Anti-Müllerian Hormone as a Major Gene for Sex Determination in Farmed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *9*, 3213–3223.
- Cai, Y., He, Z., Zhang, Q., Wang, X., Zhang, S., He, L., Yang, D., Zhang, M., & Yan, T. (2022). O estradiol up regulates the expression of Cyp19a1a and the feminization ratio in *Schizothorax prenanti*. *Aquaculture Reports*, *24*.

- Chen, J., Wang, Y., Yue, Y., Xia, X., Du, Q., & Chang, Z. (2009). A novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular and Cellular Probes*, 23(5), 235–239.
- Chen, S. L., Li, J., Deng, S. P., Tian, Y. S., Wang, Q. Y., Zhuang, Z. M., Sha, Z. X., & Xu, J. Y. (2007). Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 9(2), 273–280.
- Consuegra, S., & Rodríguez López, C. M. (2016). Epigenetic-induced alterations in sex-ratios in response to climate change: An epigenetic trap? *BioEssays*, 38(10), 950–958.
- Cui, Z., Liu, Y., Wang, W., Wang, Q., Zhang, N., Lin, F., Wang, N., Shao, C., Dong, Z., Li, Y., Yang, Y., Hu, M., Li, H., Gao, F., Wei, Z., Meng, L., Liu, Y., Wei, M., Zhu, Y., ... Chen, S. (2017). Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, 7.
- del Fresno, P. S., Garcia de Souza, J. R., Colautti, D. C., Yamamoto, Y., Yokota, M., Strüssmann, C. A., & Miranda, L. A. (2023). Sex reversal of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), a species with temperature-dependent sex determination, in a seminatural environment. *Journal of Fish Biology*, 102(1), 75–82.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2022). *Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences*. www.elsevier.com/locate/aqua-online
- El-Zaeem, S. Y., El-Hanafy, A., El-Dahhar, A. A., Elmaghraby, A. M., Ghanem, S. F., & Hendy, A. M. (2024). A Novel Investigation for Early Sex Determination in Alive Adult European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Using *cyp19a1a*, *dmrt1a*, and *dmrt1b* Genes Expression in Tail Fin tissues. *Marine Biotechnology*.
- Eschmeyer's Catalog of Fishes*. (2024). <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
- Faggion, S., Vandeputte, M., Vergnet, A., Clota, F., Blanc, M. O., Sanchez, P., Ruelle, F., & Allal, F. (2021). Sex dimorphism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): New insights into sex-related growth patterns during very early life stages. *PLoS ONE*, 16(4 April 2021).
- Fernandes, J., Diego, R., Lima, A., Silva, D. A., Lima, J. P., Miranda, A., & Oliveira, D. E. (2022). .
- Fernandino, J. I., & Hattori, R. S. (2019). Sex determination in Neotropical fish: Implications ranging from aquaculture technology to ecological assessment. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 273, pp. 172–183). Academic Press Inc.
- Francis, R. C., & Barlow, G. W. (1993). Social control of primary sex differentiation in the Midas cichlid (sex determination/growth/social dominance/teleost). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 90).
- Gabián, M., Morán, P., Fernández, A. I., Villanueva, B., Chtioui, A., Kent, M. P., Covelo-Soto, L., Fernández, A., & Saura, M. (2019). Identification of genomic regions regulating sex determination in Atlantic salmon using high density SNP data. *BMC Genomics*, 20(764).

- Galindo, H. M., Loher, T., & Hauser, L. (2011). Genetic Sex Identification and the Potential Evolution of Sex Determination in Pacific Halibut (*Hippoglossus stenolepis*). *Marine Biotechnology*, *13*(5), 1027–1037.
- García-Cruz, E. L., Yamamoto, Y., Hattori, R. S., de Vasconcelos, L. M., Yokota, M., & Strüssmann, C. A. (2020). Crowding stress during the period of sex determination causes masculinization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a fish with temperature-dependent sex determination. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, *245*.
- Geffroy, B., Besson, M., Sanchez-Baizan, N., Clota, F., Goikoetxea, A., Sadoul, B., Ruelle, F., Blanc, M.-O., Parrinelo, H., Hermet, S., Blondeau-Bidet, E., Pralong, M., Piferrer, F., Vandeputte, M., & Allaç, F. (2021). *Unraveling the genotype by environment interaction in a thermosensitive fish with a polygenic sex determination system DEVELOPMENTAL BIOLOGY*. *118*, 2112660118.
- Gong, J., Li, B., Zhao, J., Zhou, Z., Ke, Q., Zhu, Q., Xu, D., Zhou, T., & Xu, P. (2022). Sex-Specific Genomic Region Identification and Molecular Sex Marker Development of Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Marine Biotechnology*, *24*(1), 163–173.
- Guo, C. Y., Tseng, P. W., Hwang, J. S., Wu, G. C., & Chang, C. F. (2021). Potential role of DNA methylation of *cyp19a1a* promoter during sex change in protogynous orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *General and Comparative Endocrinology*, *311*.
- Hancock, G. M., Sancho, G., Munch, S. B., & Salinas, S. (2023). Effects of daily thermal fluctuations on the Atlantic silverside, a fish with temperature-dependent sex determination. *Journal of Fish Biology*.
- Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F., Martínez, P., & Porto-Foresti, F. (2014). Genetic identification of F1 and post-F1 serrasalmid juvenile hybrids in Brazilian aquaculture. *PLoS ONE*, *9*(3), 1–8.
- Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., Fernandino, J. I., Somoza, G. M., Yokota, M., & Strüssmann, C. A. (2012). A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(8), 2955–2959.
- He, Y., Fang, J., Xue, L., Wu, J., Dawar, F. U., & Mei, J. (2017). Potential contributions of heat shock proteins and related genes in sexual differentiation in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish Physiology and Biochemistry*, *43*(2), 465–475.
- Hiltsdorf, A. W. S., Hallerman, E., Valladão, G. M. R., Zaminhan-Hassemer, M., Hashimoto, D. T., Dairiki, J. K., Takahashi, L. S., Albergaria, F. C., Gomes, M. E. de S., Venturieri, R. L. L., Moreira, R. G., & Cyrino, J. E. P. (2022). The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 14, Issue 2, pp. 993–1027). John Wiley and Sons Inc.
- Hiltsdorf, A. W. S., Uliano-Silva, M., Coutinho, L. L., Montenegro, H., Almeida-Val, V. M. F., & Pinhal, D. (2021). Genome assembly and annotation of the tambaqui (*Colossoma macropomum*): an emblematic fish of the Amazon River Basin. *GigaByte*, *2021*.
- Huang, S., Wu, Y., Chen, K., Zhang, X., Zhao, J., Luo, Q., Liu, H., Wang, F., Li, K., Fei, S., Zhang, X., & Ou, M. (2023). Gene Expression and Epigenetic Modification of Aromatase

during Sex Reversal and Gonadal Development in Blotched Snakehead (*Channa maculata*). *Fishes*, 8(3).

Huang, W., Lai, J., Liang, W., Ye, S., Li, J., Zhou, J., Zhang, Y., Peng, S., Zhan, H., Zheng, P., Chen, D., Wang, K., Han, C., & Li, Q. (2024). Identification of sex-specific DNA markers in the army fish (*Spinibarbus hollandi*) by whole genome re-sequencing method.

Aquaculture, 583.

IBGE. (2024). Produção da Pecuária Municipal 2023. *Imprensa Oficial*.

Ihering, V. (1937). A method for inducing fish to spawn. *Progressive Fish-Culturist*, 4(34), 15–16.

Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., & Kikuchi, K. (2012). A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics*, 8(7).

Kijas, J., McWilliam, S., Naval Sanchez, M., Kube, P., King, H., Evans, B., Nome, T., Lien, S., & Verbyla, K. (2018). Evolution of Sex Determination Loci in Atlantic Salmon. *Scientific Reports*, 8.

Kitano, J., Ansai, S., Takehana, Y., & Yamamoto, Y. (2023). *Diversity and Convergence of Sex-Determination Mechanisms in Teleost Fish*.

Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G., & Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental Dynamics*, 237(1), 297–306.

Koseoglu, M. A., Rahimi, R., Okumus, F., & Liu, J. (2016). Bibliometric studies in tourism. *Annals of Tourism Research*, 61, 180–198.

Koyama, T., Nakamoto, M., Morishima, K., Yamashita, R., Yamashita, T., Sasaki, K., Kuruma, Y., Mizuno, N., Suzuki, M., Okada, Y., Ieda, R., Uchino, T., Tasumi, S., Hosoya, S., Uno, S., Koyama, J., Toyoda, A., Kikuchi, K., & Sakamoto, T. (2019). A SNP in a Steroidogenic Enzyme Is Associated with Phenotypic Sex in *Seriola* Fishes. *Current Biology*, 29(11), 1901–1909.

Li, M., Zhang, N., Huang, Y., Pan, C. G., Dong, Z., Lin, Z., Li, C., Jiang, Y. X., & Liang, Y. Q. (2024). The effects of 17 α -methyltestosterone on gonadal histology and gene expression along hypothalamic-pituitary-gonadal axis, germ cells, sex determination, and hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 39(3), 1494–1504.

Li, Y. L., Xing, T. F., & Liu, J. X. (2020). Genome-wide association analyses based on whole-genome sequencing of *Protosalangia hyalocranium* provide insights into sex determination of *Salangid* fishes. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 1038–1049.

Liao, Q., Gong, G., Wang, J., Xie, Y., Guo, W., & Mei, J. (2023). Identification of sex-linked codominant markers and development of a rapid LAMP-based genetic sex identification method in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 572.

- Lobo, I. K. C., Nascimento, Á. R. do, Yamagishi, M. E. B., Guiguen, Y., Silva, G. F. da, Severac, D., Amaral, A. da C., Reis, V. R., & Almeida, F. L. de. (2020). Transcriptome of tambaqui *Colossoma macropomum* during gonad differentiation: Different molecular signals leading to sex identity. *Genomics*, *112*(3), 2478–2488.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C. E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, *417*, 559–563.
- McManus, C., Pimentel, F., Pimentel, D., Sejian, V., & Blackburn, H. (2023). Bibliographic mapping of heat tolerance in farm animals. In *Livestock Science* (Vol. 269). Elsevier B.V.
- Miranda, J., Veneza, I., Ferreira, C., Santana, P., Lutz, I., Furtado, C., Pereira, P., Rabelo, L., Guerreiro-Diniz, C., Melo, M., Sampaio, I., Vallinoto, M., & Evangelista-Gomes, G. (2024). First neurotranscriptome of adults Tambaquis (*Colossoma macropomum*) with characterization and differential expression between males and females. *Scientific Reports*, *14*(1).
- Moraes, I., & O'sullivan, F. (2017). Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816). In *Scientia Amazonia*, v. 6, n (Vol. 1). <http://www.scientia-amazonia.org>
- Morais, I. S., Reis, V. R., & Almeida, F. L. (2018). *THE INFLUENCE OF WATER PH ON THE SEX DETERMINATION OF TAMBAQUI (Colossoma macropomum)*.
- Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, *191*(1), 163–170.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., Schmid, M., & Schartl, M. (2002). A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*.
- Navarro, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Di Croce, L., & Piferrer, F. (2011). DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genetics*, *7*(12).
- Nunes, J. de R. da S., Liu, S., Pértille, F., Perazza, C. A., Villela, P. M. S., De Almeida-Val, V. M. F., Hilsdorf, A. W. S., Liu, Z., & Coutinho, L. L. (2017). Large-scale SNP discovery and construction of a high-density genetic map of *Colossoma macropomum* through genotyping-by-sequencing. *Scientific Reports*, *7*.
- Oldfield, R. G. (2009). Growth patterns in Midas Cichlids are not consistent with a hypothesis of socially controlled sex determination. *Copeia*, *1*, 71–77.
- Oldfield, R. G., Mccrary, J., & Mckaye, K. R. (2006). *Habitat Use, Social Behavior, and Female and Male Size Distributions of Juvenile Midas Cichlids, Amphiphilus cf. citrinellus, in Lake Apoyo, Nicaragua*.
- Paixão, R. V., Silva, G. F., Caetano, A. R., Cintra, L. C., Varela, E. S., & O'Sullivan, F. L. A. (2022). Phylogenomic and expression analysis of *Colossoma macropomum* *cyp19a1a* and *cyp19a1b* and their non-classical role in tambaqui sex differentiation. *Gene*, *843*.

- Pan, N., Wang, M., Zhong, L., Bian, W., Chen, X., & Zhang, S. (2022). Identification of male-specific SNP markers and development of rapid PCR-based genetic sex identification method in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 547.
- Pan, Q., Kay, T., Depincé, A., Adolphi, M., Scharl, M., Guiguen, Y., & Herpin, A. (2021). Evolution of master sex determiners: TGF- β signalling pathways at regulatory crossroads. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 376, Issue 1832). Royal Society Publishing.
- Pennell, M. W., Mank, J. E., & Peichel, C. L. (2018). Transitions in sex determination and sex chromosomes across vertebrate species. *Molecular Ecology*, 27(19), 3950–3963.
- Rajendiran, P., Jaafar, F., Kar, S., Sudhakumari, C., Senthilkumaran, B., & Parhar, I. S. (2021). Sex determination and differentiation in teleost: Roles of genetics, environment, and brain. In *Biology* (Vol. 10, Issue 10). MDPI.
- Reddon, A. R., & Hurd, P. L. (2013). Water pH during early development influences sex ratio and male morph in a West African cichlid fish, *Pelvicachromis pulcher*. *Zoology*, 116(3), 139–143.
- Reichwald, K., Petzold, A., Koch, P., Downie, B. R., Hartmann, N., Pietsch, S., Baumgart, M., Chalopin, D., Felder, M., Bens, M., Sahm, A., Szafranski, K., Taudien, S., Groth, M., Arisi, I., Weise, A., Bhatt, S. S., Sharma, V., Kraus, J. M., ... Platzer, M. (2015). Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish. *Cell*, 163(6), 1527–1538.
- Reis, V. R., Paixão, R. V., de Moraes, I. da S., Bandeira, I. C., Val, A. L., da Silva, G. F., & O'Sullivan, F. L. de A. (2024). Effect of temperature on the early sexual development of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture International*, 32(2), 1719–1733.
- Renn, S. C. P., & Hurd, P. L. (2021). Epigenetic Regulation and Environmental Sex Determination in Cichlid Fishes. In *Sexual Development* (Vol. 15, Issues 1–3, pp. 93–107). S. Karger AG.
- Robertson, C. E., Wright, P. A., Köblitz, L., & Bernier, N. J. (2014). Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, *Danio rerio*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1786).
- Santi, S., Gennotte, V., Muller, M., Melard, C., Toguyeni, A., Mandiki, S. N. M., & Rougeot, C. (2019). Sex-ratio, early sex steroid profiles and *cyp19a1b*, *dmrt1* and *foxl2* gene expressions upon high temperature treatment of undifferentiated African catfish juveniles (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 499, 140–148.
- Shimose, T., Aonuma, Y., Suzuki, N., & Tanabe, T. (2016). Sexual differences in the occurrence of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* in the spawning ground, Yaeyama Islands. *Environmental Biology of Fishes*, 99(4), 351–360. <https://doi.org/10.1007/s10641-016-0478-9>
- Silva, D. X., & Ossullivan, F. L. A. (2015). *Estudo da Influência da Temperatura na Determinação Sexual de tambaqui (Colossoma macropomum)*.

- Sinclair, A. H., Berta, P., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A.-M., Lovell-Badge, R., & Goodfellow, P. N. (1990). *A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif*.
- Suda, A., Nishiki, I., Iwasaki, Y., Matsuura, A., Akita, T., Suzuki, N., & Fujiwara, A. (2019). Improvement of the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) reference genome and development of male-specific DNA markers. *Scientific Reports*, 9(1).
- Takehana, Y., Matsuda, M., Myosho, T., Suster, M. L., Kawakami, K., Shin-I, T., Kohara, Y., Kuroki, Y., Toyoda, A., Fujiyama, A., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., & Naruse, K. (2014). Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nature Communications*, 5.
- Taslina, K., Wehner, S., Taggart, J. B., De Verdal, H., Benzie, J. A. H., Bekaert, M., McAndrew, B. J., & Penman, D. J. (2020). Sex determination in the GIFT strain of tilapia is controlled by a locus in linkage group 23. *BMC Genetics*, 21(1).
- Val, A. L., & Oliveira, A. M. (2021). *Colossoma macropomum*—A tropical fish model for biology and aquaculture. In *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* (Vol. 335, Issues 9–10, pp. 761–770). John Wiley and Sons Inc.
- Valenzuela, N., Literman, R., Neuwald, J. L., Mizoguchi, B., Iverson, J. B., Riley, J. L., & Litzgus, J. D. (2019). Extreme thermal fluctuations from climate change unexpectedly accelerate demographic collapse of vertebrates with temperature-dependent sex determination. *Scientific Reports*, 9(1).
- Varela, E. S., Bekaert, M., Ganeco-Kirschnik, L. N., Torati, L. S., Shiotsuki, L., de Almeida, F. L., Villela, L. C. V., Rezende, F. P., da Silva Barroso, A., de Freitas, L. E. L., Taggart, J. B., & Migaud, H. (2021). A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*. *BMC Genomics*, 22(709).
- Wang, M., Chen, L., Zhou, Z., Xiao, J., Chen, B., Huang, P., Li, C., Xue, Y., Liu, R., Bai, Y., Yan, M., Hu, S., Dai, Y., Yang, C., Zou, X., Jiang, Z., Feng, J., Zhou, T., & Xu, P. (2023). Comparative transcriptome analysis of early sexual differentiation in the male and female gonads of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 563.
- Wang, Q., Liu, K., Feng, B., Zhang, Z., Wang, R., Tang, L., Li, W., Li, Q., Piferrer, F., & Shao, C. (2019). Transcriptome of Gonads From High Temperature Induced Sex Reversal During Sex Determination and Differentiation in Chinese Tongue Sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Frontiers in Genetics*, 10.
- Wang, Y. Y., Sun, L. X., Zhu, J. J., Zhao, Y., Wang, H., Liu, H. J., & Ji, X. S. (2017). Epigenetic control of *cyp19a1a* expression is critical for high temperature induced Nile tilapia masculinization. *Journal of Thermal Biology*, 69, 76–84.
- Wen, M., Zhang, Y., Wang, S., Hu, F., Tang, C., Li, Q., Qin, Q. B., Tao, M., Zhang, C., Zhao, R., Wang, S., Liu, Q., Tang, C., & Liu, S. (2022). Sex locus and sex markers identification using whole genome pool-sequencing approach in the largemouth bass (*Micropterus Salmoides* L.). *Aquaculture*, 559.
- Xing, T. F., Li, Y. L., & Liu, J. X. (2021). Female-specific genomic regions and molecular sex identification of the clearhead icefish (*Protosalanx hyalocranium*). *BMC Genomics*, 22(1).

Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22(15), 1423–1428.

Zhou, L., Li, M., & Wang, D. (2021). Role of sex steroids in fish sex determination and differentiation as revealed by gene editing. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 313). Academic Press Inc.

CAPÍTULO 2

MAPEAMENTO BIBLIOMÉTRICO DA DETERMINAÇÃO DO SEXO EM PEIXES

RESUMO

MAPEAMENTO BIBLIOMÉTRICO DA DETERMINAÇÃO DO SEXO EM PEIXES

Nayelle Meyre Lisboa Silva¹, Patrícia Ianella², Alexandre Rodrigues Caetano³

1 Bióloga/ Doutoranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

2 Bióloga/ Doutora – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

3 Zootecnista/ Doutor – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Os estudos de determinação do sexo em peixes são relevantes em diversos aspectos como na piscicultura, na análise comparativa de genomas e na biologia da conservação. O presente estudo teve como objetivo compreender a evolução e as tendências dos estudos científicos que tratam da determinação do sexo em peixes. O software VOSviewer foi utilizado para mapear Coautoria, Coocorrência de palavras-chaves, Citação, Acoplamento bibliográfico e Cocitação. O banco de dados utilizado para buscar os artigos foi o PubMed. Os principais resultados obtidos foram: (1) 1.539 documentos encontrados de 65 países, sendo China, EUA e Japão foram os que mais publicaram; (2) a maioria dos documentos são artigos de revistas científicas (82%), revisões (11%) e estudos comparativos (6%); (3) as três principais instituições são a Universidade de Wurzburg, INRAE e a Academia Chinesa de Ciências da Pesca; (4) as publicações ocorreram em 294 jornais e revistas, sendo que os mais notáveis foram “General and Comparative Endocrinology”, “Journal of Fish Biology” e “PLoS One”; (5) as espécies mais estudadas foram *Oryzias latipes* (131 artigos), *Danio rerio* (114) e *Oreochromis niloticus*

(75); (6) o principal conteúdo abordado foi expressão gênica durante os processos de determinação e diferenciação genética do sexo; (7) os parâmetros encontrados para os artigos mostram 4.305 coautores e 2.531 palavras-chaves citadas pelos autores nos diferentes artigos; (8) na coautoria as publicações foram agrupadas em 25, 11 e 7 grupos de autores, instituições e países, respectivamente; (9) no acoplamento bibliográfico apenas 6 clusters foram formados para documentos. Foi notado que a espécie *Salmo salar* (o salmão do atlântico), a qual representou 32,6% da aquicultura marinha e costeira de todas as espécies de peixes ósseos em 2020, teve somente 15 documentos abordando a determinação do sexo na espécie. Além disso, países que estão entre os cinco maiores consumidores de alimentos aquáticos do mundo, como Índia e Indonésia, realizaram somente 12 e 3 estudos sobre a determinação do sexo, respectivamente. O estudo bibliométrico pode apresentar viés em diferentes etapas das análises, como na seleção dos artigos, nas citações e nas palavras-chaves, no entanto o presente estudo mostra-se relevante para compreender o campo de investigação da determinação do sexo em peixes.

PALAVRAS-CHAVES: diferenciação do sexo; gene mestre determinante do sexo; piscicultura; VOSviewer.

ABSTRACT

BIBLIOMETRIC MAPPING OF SEX DETERMINATION IN FISH

Studies on sex determination in fish are relevant in several aspects, such as fish farming, comparative genome analysis and conservation biology. The present study aimed to understand the evolution and trends of scientific studies that deal with sex determination in fish. The VOSviewer software was used to construct a network Co-authorship, Co-occurrence of keywords, Citation, Bibliographic coupling and Co-citation. The database used to search for articles was PubMed. The main results obtained were: (1) 1,539 documents found from 65 countries, with China, the USA and Japan being the ones that published the most; (2) most of the documents are research articles (82%), reviews (11%) and comparative studies (6%); (3) the three main institutions are the University of Würzburg, INRAE and the Chinese Academy of Fisheries Sciences; (4) publications occurred in 294 newspapers and magazines, the most notable being General and Comparative Endocrinology, Journal of Fish Biology and PLoS One; (5) the most studied species were *Oryzias latipes* (131 articles), *Danio rerio* (114) and *Oreochromis niloticus* (75); (6) the main content addressed was gene expression during the processes of genetic sex determination and differentiation; (7) the parameters found for the articles show 4,305 co-authors and 2,531 keywords cited by the authors in the different articles; (8) in co-authorship the publications were grouped into 25, 11 and 7 groups of authors, institutions and countries, respectively; (9) in bibliographic coupling only 6 clusters were formed for documents. It was noted that the species *Salmo salar* (Atlantic salmon), which represented 32.6% of marine and coastal aquaculture of all finfish species in 2020, had only 15 documents addressing sex determination in the species. In addition, countries that are among the five largest consumers of aquatic foods in the world, such as India and Indonesia, carried out only 12 and 3 studies on sex determination, respectively. The bibliometric study may present bias at different stages of the analysis, such as in the selection of articles, in citations and in

keywords; however, the present study is relevant to understand the field of research on sex determination in fish.

KEYWORDS: fish farming; master sex-determining sex; sex differentiation; VOSviewer.

2.1 INTRODUÇÃO

Os peixes representam o grupo mais diversificado de vertebrados, incluindo mais de 36.000 espécies (*Eschmeyer's Catalog of Fishes*, 2024). Essa diversidade é reflexo da sua elevada capacidade de adaptação a um amplo espectro de condições ambientais, como recifes de corais, florestas, rios, riachos e mar aberto. Como resultado, os peixes apresentam várias adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais para viver nesses ambientes aquáticos (Martínez et al., 2014). Os peixes também apresentam todos os tipos de estratégias reprodutivas: 1) o desenvolvimento gonadal pode ser gonocorístico ou hermafrodita; 2) inúmeros sistemas de determinação do sexo são encontrados (principalmente XX/XY, ZZ/ZW, além das suas variantes); 3) a determinação sexual genética (GSD – *Genetic Sexual Determination*) pode ser definida por um gene crítico (MSD – gene mestre determinante do sexo) localizado em um cromossomo sexual ou por múltiplos genes situados tanto em autossomos como em cromossomos sexuais; 4) pode ocorrer determinação ambiental do sexo (ESD – *Environmental Sexual Determination*) devido a vários fatores ambientais; 5) muitas espécies tem o sexo determinado pela combinação de GSD e ESD (Rajendiran et al., 2021). Essas características demonstram um dos pontos relevantes para a realização de estudos de determinação do sexo em peixes, uma vez que a biologia e a ecologia desses animais são suficientemente diversas para fornecer exemplos únicos que podem ser utilizados para estudos científicos para elucidação de conhecimentos básicos sobre a determinação do sexo de vertebrados em geral, e estudos para desenvolvimento de tecnologias aplicadas a produção de peixes em cativeiro.

A diversidade biológica observada nos peixes também apresenta aspectos interessantes para a domesticação de peixes para produção em cativeiro. Segundo a FAO (2022), em 2020 a produção de teleósteos foi de mais de 57 milhões de toneladas em todo o mundo, a partir de animais reproduzidos e engordados em cativeiro considerando diferentes

sistemas de produção, inclusive técnicas de produção de populações monossexuais nos casos onde existem dimorfismos sexuais de crescimento, que podem ocorrer a favor dos machos (Ex: *Pelteobagrus fulvidraco* e *Oreochromis niloticus*) ou das fêmeas (Ex: *Cyprinus carpio* e *Cynoglossus semilaevis*) (He et al., 2017; Taslima et al., 2020; Wang et al., 2023; Wang et al., 2019). Dimorfismos sexuais de crescimento ocorrem devido à maturação sexual tardia em algum dos sexos, no qual a energia derivada dos alimentos é destinada principalmente ao crescimento corporal (Chen et al., 2022). Além disso, em algumas espécies, existem características importantes associadas a um dos sexos além do crescimento, como por exemplo cor, formato do corpo, ornamentos sexuais secundários, observados tanto em espécies utilizadas para a produção de alimentos como em espécies ornamentais (Martínez et al., 2014).

Outro ponto relevante para a realização de estudos de determinação do sexo em peixes está relacionado com a biologia da conservação. Como dito anteriormente, pode ocorrer determinação sexual genética (GSD) e/ou ambiental (ESD). A variável ambiental mais bem caracterizada e prevalente que afeta o sexo nos peixes é a temperatura (TSD - *Temperature Sex Determination*) (Valdivieso et al., 2022), o que tem levantado um intenso debate sobre possíveis consequências do aquecimento global (Consuegra & Rodríguez López, 2016; Research; 2021; Valenzuela et al., 2019), uma vez que a temperatura elevada faz com que algumas fêmeas genéticas se tornem machos fenotípicos (neomachos) ou vice-versa (Yamamoto et al., 2019). A presença de neomachos pode levar a proporções sexuais desequilibradas, como tem sido relatado em populações naturais de diversas espécies, como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e medaka (*Oryzias latipes*) (Bezault et al., 2007; Valenzuela et al., 2019). As consequências previstas do aquecimento global vão além das alterações nos regimes térmicos dos habitats aquáticos. Estudos apontam que a continuação das alterações climáticas também poderia levar ao aumento da salinidade, diminuição das concentrações de oxigênio dissolvido e redução do pH da água (Shinomiya et al., 2010), o que poderia potencializar os efeitos sobre o balanço sexual de espécies cuja determinação sexual pode ser afetada por esses fatores.

Pode-se notar que existe muito conhecimento acumulado sobre a determinação do sexo em espécies de teleósteos no geral. No entanto, as pesquisas sobre os mecanismos de determinação sexual e diferenciação gonadal da espécie nativa economicamente mais importante do Brasil, o tambaqui (*Colossoma macropomum*), são escassas e fragmentadas. O conhecimento acumulado sobre a determinação do sexo de diferentes espécies de peixes e as lacunas, como a compreensão da determinação do sexo do tambaqui, podem ser avaliados em estudos de análises bibliométricas, uma vez que essa técnica permite analisar, resumir, agrupar e comentar os resultados das pesquisas e os problemas existentes em um determinado período.

Com essas análises é possível identificar lacunas na abordagem dos conteúdos e propor soluções (McManus et al., 2023b). Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo compreender a evolução e as tendências dos estudos científicos que tratam da determinação do sexo em diferentes espécies de peixes, dentre elas o tambaqui.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

A literatura global sobre determinação do sexo em diferentes espécies de peixes foi identificada no PubMed. As informações incluíram: ano de publicação, idioma, periódico, título, autor, afiliação, palavras-chaves, tipo de documento, resumo e citações; e foram exportadas em arquivos .txt separados por tabulações. A data da recuperação foi 27 de julho de 2023. O software VOSviewer (versão 1.6.20) (van Eck & Waltman, 2014) foi utilizado para mapear Coautoria, Coocorrência de palavras-chaves, Citações, Acoplamento bibliográfico e Cocitação nos arquivos gerados. Foi usada a contagem completa devido a maior facilidade que essa metodologia proporciona em interpretar os dados, quando comparada a contagem fracionada (Perianes-Rodriguez et al., 2016). Os parâmetros utilizados nas análises podem ser vistos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Parâmetros bibliométricos utilizados no software VOSviewer para publicações sobre determinação do sexo em peixes.

	Nº total de artigos	Documentos mínimos por:	Número atingido limite	Com links	Clusters
Coautores					
Autores	4.305	2	309	1.347	25
Instituições	1.341	5	168	165	11
Países	69	2	50	50	7
Coocorrência					
Todas as palavras-chaves	5.191	10	264	264	5
Citação					

Documentos	1505	6	1243	1243	14
Fontes	267	5	77	77	28
Autores	4305	5	309	309	6
Instituições	1341	5	170	170	31
Países	69	3	46	46	12
<hr/>					
Acoplamento bibliométrico					
Documentos	1505	5	1280	1280	6
Fontes	267	3	120	120	5
Autores	5315	5	224	224	7
Instituições	1343	5	172	172	4
Países	69	3	46	46	4
<hr/>					
Cocitação					
Referências	38.125	5	2.931	2.931	5
Autores	6.540	20	411	411	6
Fontes	23.579	20	625	625	5

Nas redes geradas pelo VOSviewer são visualizados os rótulos que estão dentro de círculos e as linhas que conectam os rótulos. A cor das linhas é mais forte quando os rótulos (Ex: palavra-chave, autor, país e instituição) são encontrados em maior frequência em diferentes estudos e mais fraca quando essa frequência for menor. As redes podem ser visualizadas de duas formas no presente estudo. Na primeira, os círculos coloridos mostram os principais resultados de cada análise, ocorre a formação de clusters e cada um deles é representado por uma cor. Na segunda rede, os círculos nas cores roxo, azul, verde e amarelo representam linhas do tempo. Essas cores representam o ano em que os documentos foram publicados. Quanto mais azul ou roxo o círculo, mais antiga é a produção científica, e quanto mais amarelo, mais recente (van Eck & Waltman, 2014).

No caso da coautoria, os rótulos podem se referir aos autores, países ou instituições e os tamanhos dos círculos indicam o maior número de coautorias (van Eck & Waltman, 2014). Na coocorrência a rede foi feita com as palavras-chaves que ocorrem juntas em diferentes publicações. Termos duplicados como medaka e *Oryzias latipes* foram unidos, assim como termos singulares e plurais.

Por fim, foram feitas análises de citação, acoplamento bibliográfico e cocitação. O acoplamento ocorre quando dois documentos diferentes fazem referência a um terceiro documento, é esperado que ocorra uma grande relação entre estes artigos e a presença deles no mesmo cluster. Já a cocitação ocorre quando dois estudos separados são referenciados por um terceiro documento (Mas-Tur et al., 2021) (Figura 2.1). Em todas as análises, foi possível baixar informações dos clusters para análises posteriores.

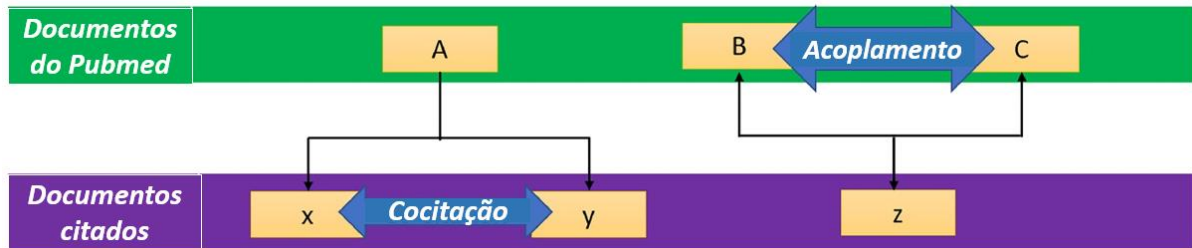


Figura 2.1: Diagrama da análise de citações usadas no estudo.

2.3 RESULTADOS

No total, foram encontrados 1.992 artigos que atenderam aos critérios da busca. Foi realizada uma filtragem manual para excluir artigos que não abordavam a determinação do sexo em peixes. Com isso, restaram 1.539 documentos de 65 países. Cerca de 49% dos artigos são de 3 países, sendo 19% da China, 18% dos Estados Unidos e 12% do Japão. Analisando os países da América Latina, o Brasil é o país que mais produz artigos no assunto, seguido pela Argentina (Figura 2.2).

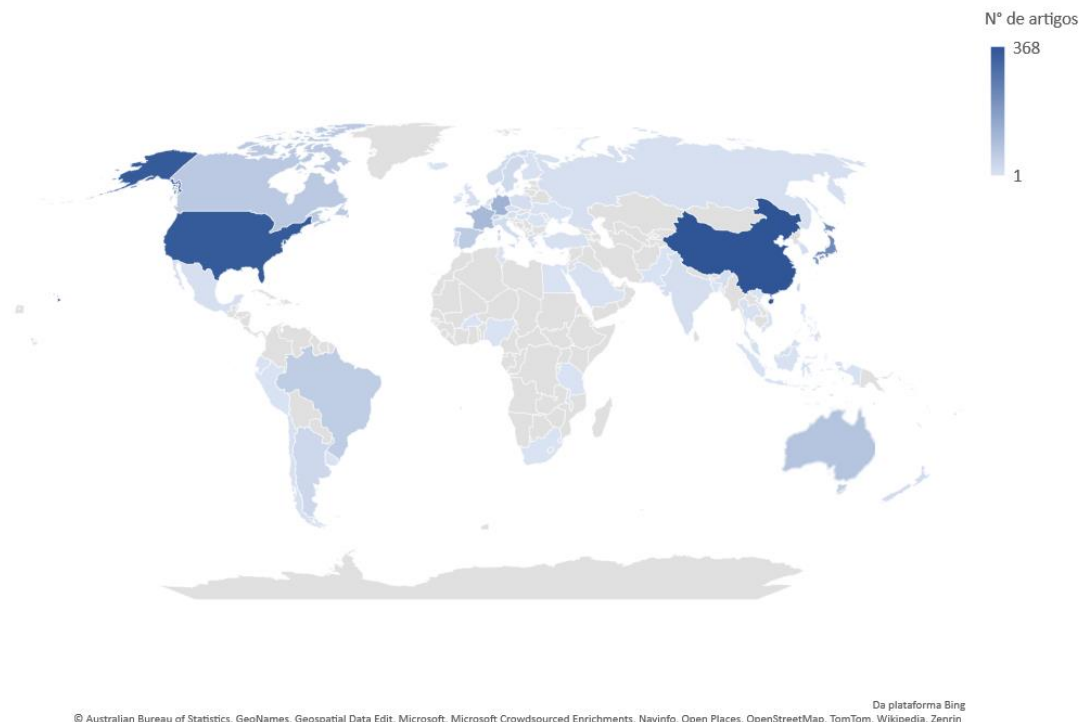


Figura 2.2: Mapa de calor para países que publicam artigos sobre determinação do sexo em peixes. Um azul mais escuro significa mais publicações.

O primeiro documento encontrado na base de dados é de 1936. Houve um aumento constante no número de artigos ao longo do tempo, com maior crescimento ocorrendo

a partir de 2000 (Figura 2.3A). A maioria dos documentos são artigos de pesquisa (82%), revisões (11%) e estudos comparativos (6%) (Figura 2.3B). As três principais instituições são a Universidade de Wurzburg (Alemanha), INRAE (França) e a Academia Chinesa de Ciências da Pesca (Figura 2.3C). As publicações ocorreram em 294 jornais e revistas, sendo que os mais notáveis foram “General and Comparative Endocrinology”, “Journal of Fish Biology” e “PLoS One” (Figura 2.3D).

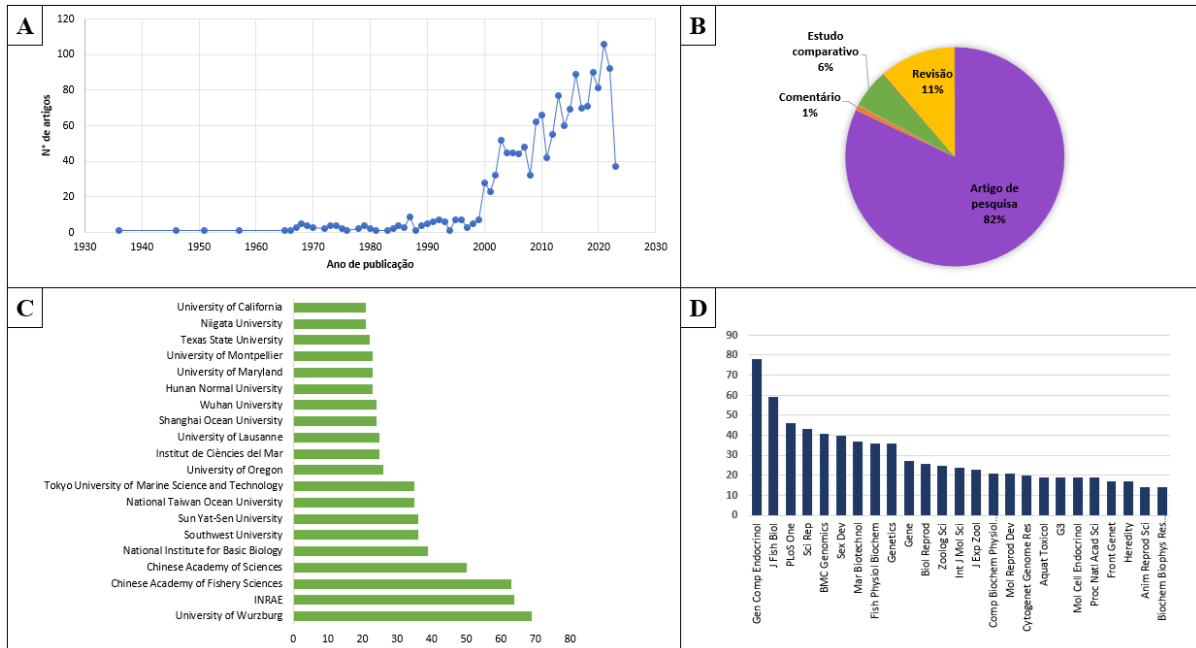


Figura 2.3: Documentos publicados sobre a determinação do sexo em peixes. (A) Número de artigos por ano, (B) tipo de documento, (C) principais instituições, (D) principais jornais e revistas.

Dentre os 1.539 artigos, um total de 413 espécies de 254 gêneros, 150 famílias e 71 ordens foram estudadas, sendo que 131 artigos abordaram *Oryzias latipes*, 114 *Danio rerio* e 75 *Oreochromis niloticus*. Em relação aos documentos que realizaram pesquisas com o tambaqui, foram encontrados somente três: Hoga et al. (2019) que criaram um protocolo básico para produção de fêmeas monosssexuais por meio de feminização direta usando 17 β -estradiol; Varela et al. (2021) que geraram um mapa de ligação genético com 14.805 SNPs e identificaram a região associada ao sexo em um único cromossomo sugerindo um sistema heterogamético masculino XX/XY; e Lobo et al. (2020) que fizeram o sequenciamento do transcriptoma de peixes juvenis para compreender a rede molecular envolvida na diferenciação sexual gonadal.

Os principais conteúdos abordados em todas as espécies de peixes, que foram registrados manualmente, estão especificados nas Tabelas 2.2 e 2.3. Cerca de 516 artigos

estudaram expressão gênica durante os processos de determinação e diferenciação genética do sexo, 256 avaliaram determinação ambiental do sexo, 105 fizeram descobertas iniciais de regiões genômicas determinantes do sexo, 58 determinaram sistemas do sexo e 49 desenvolveram ferramentas para identificação ou determinação genética do sexo.

Tabela 2.2: Detalhamento dos artigos que tinham como tema determinação ambiental do sexo em peixes.

Determinação ambiental do sexo	Tipos	N° de artigos que abordaram o assunto
		Temperatura
	Hormônio	85
	Social	18
	Bisfenol	6
	Fadrozole	6
	Nonilfenol	6
	Herbicida	4
	Letrozole	4
	Hipoxia	2
	Luz	2
	Óleo	2
	Perclorato	2
	Outros	34
	Total	256

Tabela 2.3: Detalhamento dos artigos que tinham como tema determinação genética do sexo em peixes.

Determinação genética do sexo	Sistemas de determinação	N° de artigos que abordaram o assunto
		XX/XY
	ZZ/ZY	16
	Poligênica	6

	XX/XY e ZZ/ZY	3
	ZZ/ZW1W2	1
	Múltiplos sistemas de cromossomos sexuais	1
	Total	58
	SNPs	15
	Fragmento sexo específico	15
Desenvolvimento de ferramentas	Microssatélite	7
	AFLP	6
	RAPD	4
	RFLP	1
	Total	48

Os parâmetros encontrados para os artigos no PubMed (Tabela 2.1) mostram 4.305 coautores e 2.531 palavras-chaves citadas pelos autores nos diferentes artigos. Na coautoria as publicações foram agrupadas em 13, 11 e 7 grupos de autores, instituições e países, respectivamente. Enquanto no acoplamento bibliográfico apenas seis clusters foram formados para documentos e cinco grupos de referências cocitadas.

Na Figura 2.4A o pesquisador Manfred Schartl (grupo azul escuro) se destacou no mapeamento de coautoria de autores, seguido de Yan Zhang (grupo vermelho), além disso foram observados vários clusters com pouca conexão entre eles, o que ocorreu devido a abordagem de diferentes assuntos. Os principais temas deste estudo envolvem: evolução e genes mestres determinantes do sexo (MSD), especialmente o *dmrt* que é o MSD da medaka (*Oryzias latipes*) (azul escuro); transcriptoma da tilápia do Nilo e de espécies de peixes nativas da China como o linguado chinês (*Cynoglossus semilaevis*) (vermelho); plasticidade (verde); e identificação de regiões determinantes do sexo em ciclídeos (azul claro). Os autores de cada cluster, frequentemente, apresentaram nacionalidades em comum, no cluster vermelho, por exemplo, a maioria dos pesquisadores são chineses, enquanto no cluster azul claro mais da metade dos cientistas são japoneses. Em relação a linha do tempo, os grupos com uma data média de publicação mais antiga são os japoneses e os grupos mais jovens são os chineses.

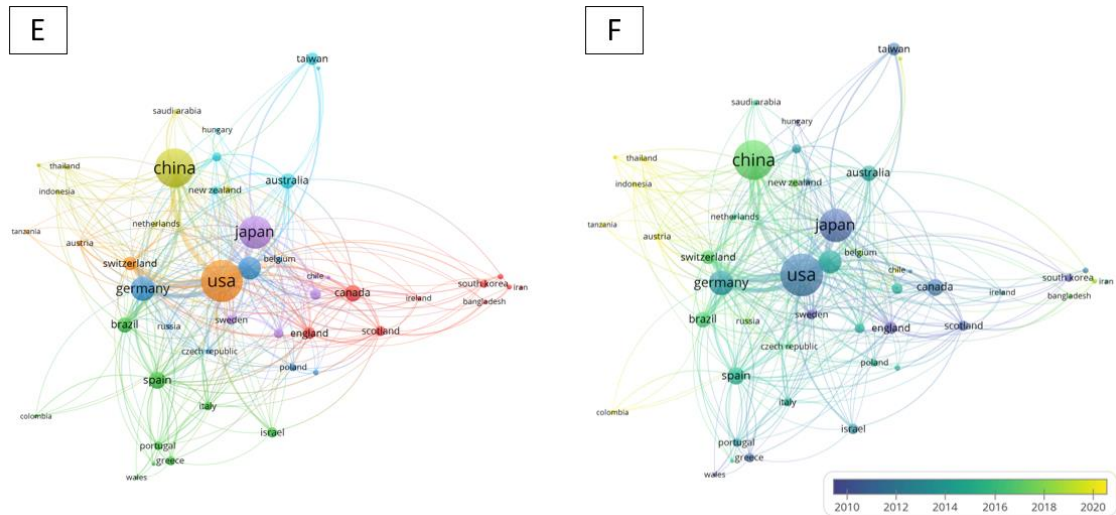


Figura 2.4: Mapas bibliométricos de coautoria para autores (A e B), instituições (C e D) e países (E e F) do VOSviewer para publicações sobre determinação do sexo em peixes. Para cada tipo de coautoria existem dois mapas, a esquerda os círculos coloridos mostram os principais resultados de cada análise e a direita os círculos nas cores roxo, azul, verde e amarelo são linhas do tempo.

A Figura 2.5 mostra as palavras-chaves mais recorrentes nos artigos sobre a determinação de sexo em peixes. As palavras-chaves *Oryzias latipes*, evolução e teleósteos são observadas com frequência. Algumas das palavras-chaves mais atuais, em amarelo, são transcriptoma, mudança climática, masculinização, estresse, epigenética.

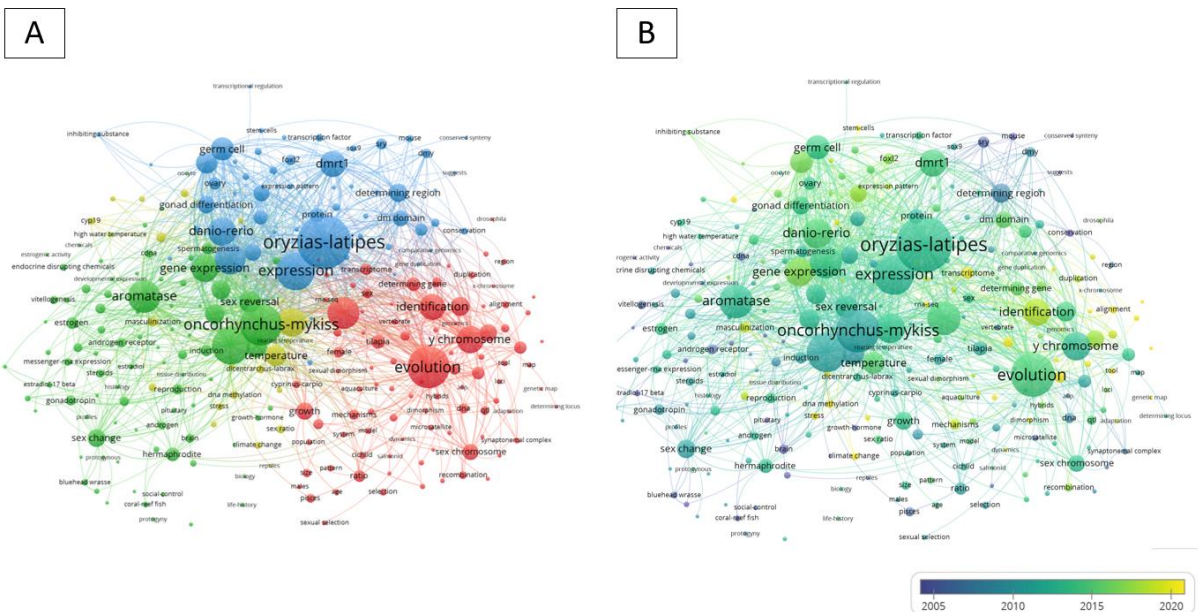


Figura 2.5: Mapas bibliométricos de coocorrência de todas as palavras-chaves do VOSviewer para publicações sobre determinação do sexo em peixes. São apresentados dois mapas, a esquerda os círculos coloridos mostram os principais resultados de cada análise e a direita os círculos nas cores roxo, azul, verde e amarelo são linhas do tempo.

Os 20 principais autores e seus países de origem mostram a predominância do Japão (7), China (5) e EUA (3) (Tabela 2.4). O ano médio de publicações da maioria dos autores japoneses foi 2008, enquanto a média da China foi de anos mais recentes (2015-2019), o que indica que os pesquisadores chineses começaram a realizar estudos sobre a determinação do sexo de peixes principalmente nos últimos anos.

Tabela 2.4: Os 20 principais autores de publicações sobre determinação do sexo em peixes.

País	Documentos	Citações	Força total do link	Ano médio de publicações
Alemanha 1	74	4328	430	2012
EUA 1	42	1197	285	2016
França 1	38	2424	266	2014
China 1	36	1538	220	2016
Japão 1	35	3499	183	2008
Alemanha 2	30	1047	190	2017
China 2	30	1331	175	2015
Espanha 1	30	2345	134	2014
Japão 2	28	2900	117	2008
Japão 3	27	2722	116	2008
Japão 4	26	1327	94	2008
China 3	25	539	143	2016
Japão 5	25	1211	108	2015
EUA 2	25	396	206	2018
China 4	23	403	185	2019
Japão 6	23	2380	96	2007
EUA 3	23	1376	103	2014
China 5	22	411	147	2017
Inglaterra 1	22	467	194	2018

*Os números sequenciais se referem aos diferentes autores de cada país.

Na análise de citação os padrões dos autores, países e das instituições são semelhantes aos observados na coautoria. Os documentos mais citados estão no cluster verde, sendo que esse grupo aborda principalmente a determinação do sexo em espécies modelos como o peixe zebra (*Danio rerio*) e medaka (*Oryzias latipes*). Os artigos do cluster vermelho desenvolveram pesquisas em evolução, enquanto o cluster amarelo em determinação ambiental do sexo e o cluster azul em diferenciação e mudança do sexo (Figura 2.6A). Em relação a linha do tempo, os documentos mais recentes apresentaram o menor círculo, ou seja, foram menos citados (Figura 2.5B).

Howe et al. (2013) foi o artigo com maior número de citações (2.874), nele os autores realizaram o sequenciamento do genoma referência do peixe zebra e verificaram sua relação com o genoma humano. Matsuda et al. (2002) foi o segundo artigo mais citado, no qual os autores descobriram que *Dmy* é um forte candidato para o gene determinante do sexo em medaka (*Oryzias latipes*). Ambos os artigos foram publicados na revista Nature (Tabela 2.5 e Figura 2.6 A).

Tabela 2.5: Artigos mais referenciados para publicações sobre determinação do sexo em peixes.

Artigos	Citações	URL
Howe et al. (2013)	2874	https://doi.org/10.1038/nature12111
Matsuda et al. (2002)	1071	https://doi.org/10.1038/nature751
Kasahara et al. (2007)	840	https://doi.org/10.1038/nature05846
Nanda et al. (2002)	665	https://doi.org/10.1073/pnas.182314699
Chen et al. (2014)	555	https://doi.org/10.1038/ng.2890
Guiguen et al. (2010)	487	https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.002
Volff (2005)	477	https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800635
Kamiya et al. (2012)	402	https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002798
Klattenhoff & theurkauf (2008)	389	https://doi.org/10.1242/dev.006486
Sakamoto et al. (2000)	385	https://doi.org/10.1093/genetics/155.3.1331
Ospina-alvarez & Piferrer (2008)	374	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002837

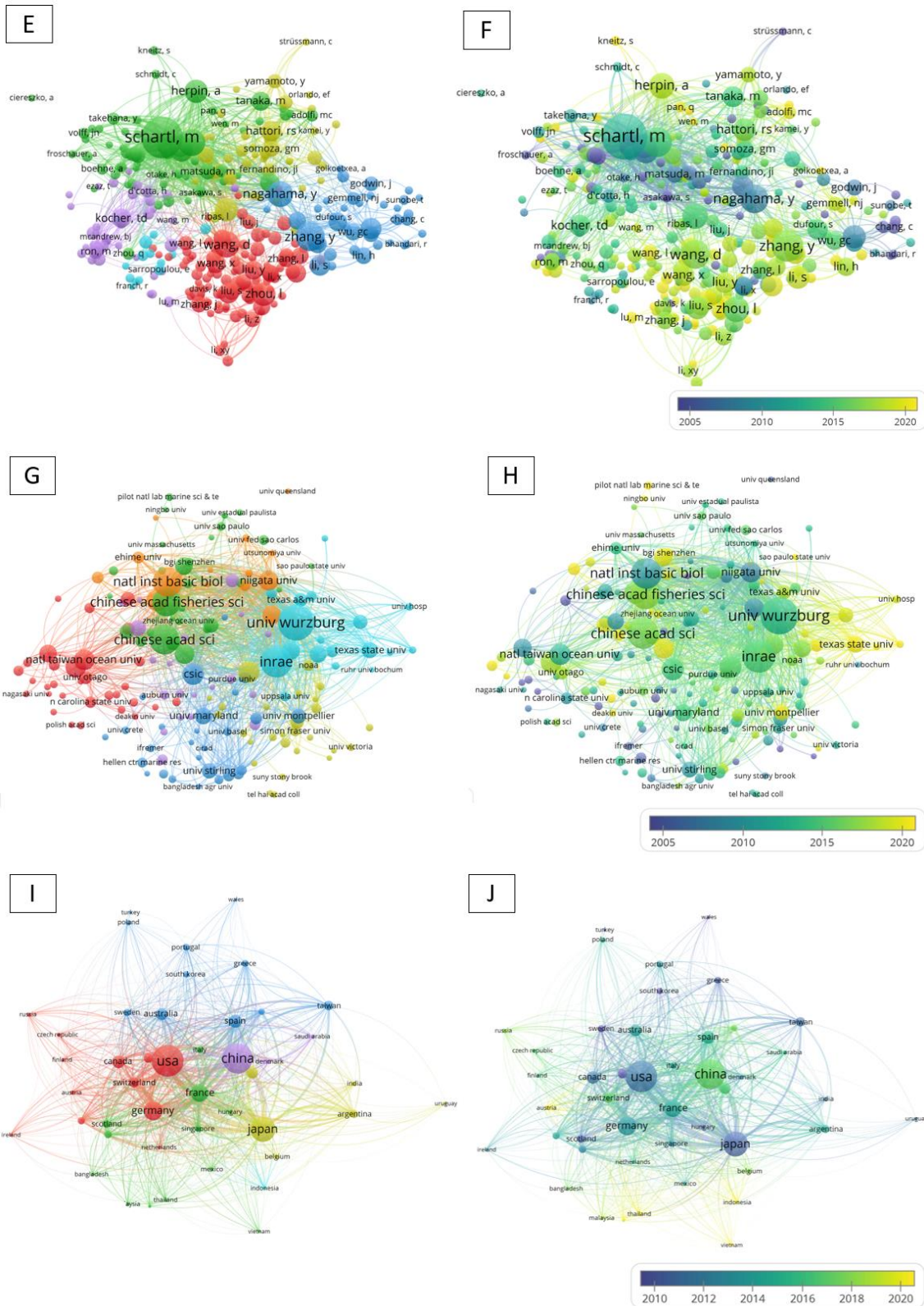
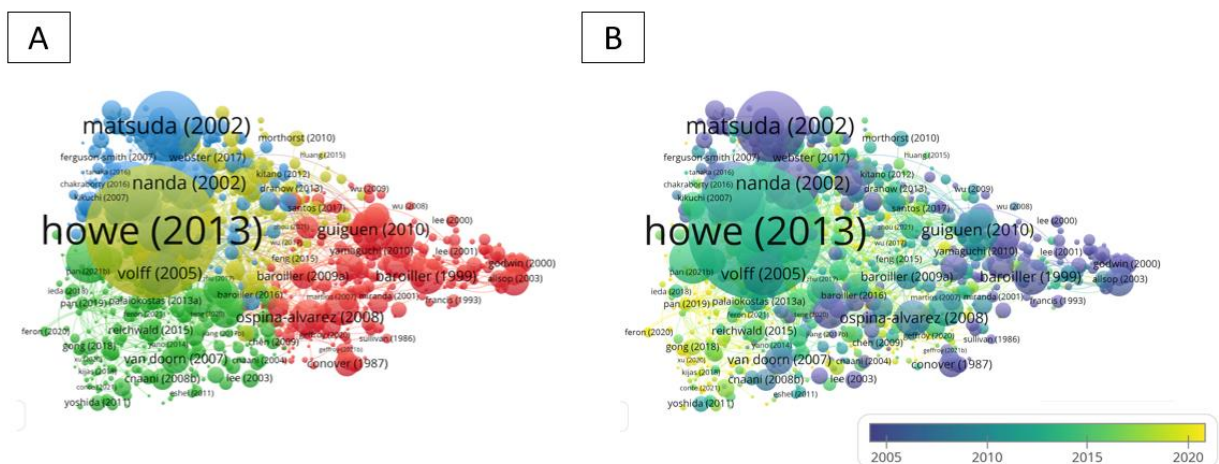


Figura 2.6: Mapas bibliométricos de citação dos documentos (A e B), fontes (C e D), autores (E e F), instituições (G e H) e países (I e J) do VOSviewer para publicações sobre determinação do sexo em peixes. Para cada tipo de citação existem dois mapas, a esquerda os círculos

coloridos mostram os principais resultados de cada análise e a direita os círculos nas cores roxo, azul, verde e amarelo são linhas do tempo.

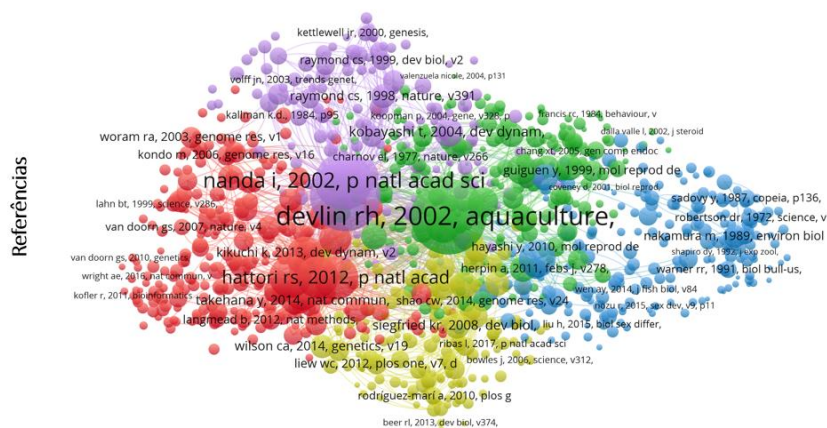
No acoplamento bibliográfico, novamente, se destacaram: os autores Schartl, M. Guiguen, Y. e Herpin, A.; os países EUA, China e Japão; os periódicos “General and Comparative Endocrinology”, “Journal of Fish Biology”, e “PLoS One”; e as instituições Universidade de Wurzburg, o INRAE e a Academia de Ciências Chinesa. Um grande grupo (amarelo) de autores acoplados é ancorado por Francesc Piferrer (Figura 2.7E) que tem como foco os estudos sobre epigenética, fisiologia dos peixes, aquicultura e domesticação. No mesmo cluster, é encontrado Ching-Fong Chang, cuja investigação se concentra em endocrinologia molecular, biologia molecular, endocrinologia reprodutiva e ecofisiologia em peixes e corais. Os demais grandes aglomerados são ancorados por Manfred Schartl (verde) e por Minoru Tanaka (azul). O primeiro tem como foco estudos com transdução de sinal e a regulação genética no melanoma, usando o sistema modelo *Xiphophorus*, além da determinação sexual e evolução em peixes. Já Minoru Tanaka realiza pesquisas sobre diferenciação sexual, célula germinativa, genoma e duplicação genética com foco no gênero *Oryzias*. O cluster ancorado por Manfred Schartl (verde) é formado por autores que tendem a pesquisar determinação do sexo em peixes adentrando as consequências funcionais e evolutivas da duplicação genética. O cluster azul, ancorado por Minoru Tanaka, é composto por autores que tem como foco estudos sobre a determinação/diferenciação sexual em medaka (*Oryzias latipes*).



os círculos coloridos mostram os principais resultados de cada análise e a direita os círculos nas cores roxo, azul, verde e amarelo são linhas do tempo.

As fontes mais citadas na análise de cocitação foram “General and Comparative Endocrinology”, “Aquaculture” e “Nature”. O primeiro período foi criado em 1961 e é um dos jornais referência no assunto. “Aquaculture” publica contribuições científicas internacionais relacionadas à aquicultura e pesquisas sobre a determinação do sexo em peixes é relevante para esse ramo. Além disso, estudos de grande impacto são publicadas na “Nature”.

Os três principais autores que se destacaram na cocitação foram Matsuda M, Devlin R.H. e Baroiller J.F. Na Figura 2.8 estão os documentos mais referenciados e na Tabela 2.6 é encontrado o detalhamento dos 20 principais artigos. As publicações destes artigos foram feitas principalmente na “Nature” (4) e no “Proceedings of the National Academy of Sciences” (3). Os artigos mais recentes são Takehana et al. (2014), Chen et al. (2014) e Bachtrog et al. (2014). O documento mais referenciado foi Devlin e Nagahama (2002) com 423 citações, seguido de Matsuda et al. (2002) com 380 citações. Isso é esperado, uma vez que Devlin e Nagahama (2002) fizeram um artigo de revisão amplo e detalhado sobre a determinação e diferenciação do sexo em peixes, enquanto Matsuda et al (2002) descobriram o primeiro gene mestre determinante do sexo em teleósteos. Dentre os artigos presentes na Tabela 2.6, a maioria são sobre genes responsáveis pela determinação e diferenciação sexual.



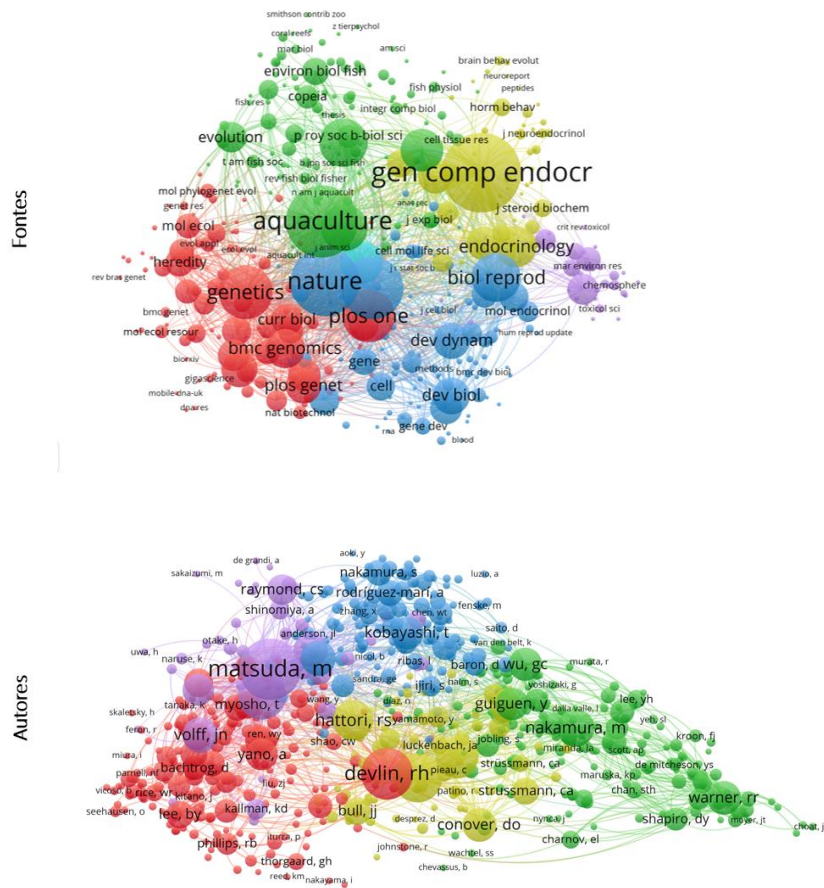


Figura 2.8: Análise de cocitação para publicações sobre determinação do sexo em peixes.

Tabela 2.6: Principais artigos coocitados para publicações sobre determinação do sexo em peixes.

Referências	Citações	Força total do link
Devlin RH, Nagahama Y. (2022). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. <i>Aquaculture</i> .	423	11462
Matsuda, M, Nagahama, Y, Shinomiya, A. et al. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. <i>Nature</i> .	380	11133
Nanda I, Kondo M, Hornung U. et al. (2022). A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining	273	8286

region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. Proc Natl Acad Sci U.S.A.

Hattori RS, Murai Y, Oura M. et al. (2012). A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. Proc Natl Acad Sci U.S.A.	180	6539
Kamiya T, Kai W, Tasumi S. et al. (2012). A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, <i>Takifugu rubripes</i> (fugu). PLoS Genet.	172	6222
Myosho T, Otake H, Masuyama H. et al. (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, <i>Oryzias luzonensis</i> . Genetics	166	6013
Yano A, Guyomard R, Nicol B. et al. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i> . Curr Biol.	147	5240
Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F. et al. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. Gen Comp Endocrinol.	138	5250
Sinclair AH, Berta P, Palmer MS. et al. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature	134	3701
Chen S, Zhang G, Shao C. et al. (2014). Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. Nat Genet.	129	4021
Ospina-Alvarez N, Piferrer F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. PLoS One	118	4436

Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T. et al. (2009). The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. <i>Nature</i> .	110	3900
Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T. et al. (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> . <i>Biol Reprod</i>	101	3920
Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. <i>Cell. Mol. Life Sci</i> .	99	3036
Kobayashi T, Matsuda M, Kajiura-Kobayashi H. et al. (2004). Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, <i>Oryzias latipes</i> . <i>Dev Dyn</i> .	94	3060
Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL. et al. (2014). Sex determination: why so many ways of doing it? <i>PLoS Biol</i> .	90	2999
Rodríguez-Marí A, Yan YL, Bremiller RA. et al. (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (Amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. <i>Gene Expr. Patterns</i> .	86	3066
Takehana Y, Matsuda M, Myosho T. et al. (2014). Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish <i>Oryzias dancena</i> . <i>Nat Commun</i> .	84	3249
Koopman P, Gubbay J, Vivian N. et al. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. <i>Nature</i> .	82	2274
Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H. et al. (2008). A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in <i>Xenopus laevis</i> . <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> .	80	3162

2.4 DISCUSSÃO

A análise bibliométrica da literatura científica relacionada a determinação do sexo em peixes demonstrou que os países que publicaram mais artigos científicos no assunto foram a China, os EUA e o Japão. Existe uma relação desse resultado com a produção e o consumo de peixes nesses países. Segundo a FAO (2020) a Ásia teve a maior produção de peixes (50.029.487 toneladas), seguido da Europa (2.673.669 toneladas) e das Américas (2.420.696 toneladas). A China tornou-se o maior produtor, exportador e processador mundial de produtos aquáticos nos últimos anos. Em 2019, cerca de 59% do consumo de alimentos aquáticos foi da China, Indonésia, Índia, EUA e Japão, sendo que a China consumiu 36% desses alimentos. Esse crescimento do país ocorreu devido à sua grande expansão na produção da pesca e da aquicultura e ao aumento da população. Apesar da Índia e Indonésia consumirem muitos alimentos de origem aquática, esses países publicaram somente 12 e 3 artigos, respectivamente, sobre a determinação do sexo em peixes. Dentre os países da América Latina, o Brasil teve o maior número de artigos publicados. Em 2022, o país produziu mais de 617 mil toneladas de peixes e existe uma grande perspectiva para aumento da produção nos próximos anos (IBGE, 2024). O peixe mais produzido é a tilápia (*O. niloticus*) e acredita-se que o país se torne o maior produtor do mundo da espécie nos próximos 20 anos. Além disso, existem espécies nativas com potencial de exploração comercial, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Embrapa, 2024.).

O *C. macropomum* teve a produção nacional maior que 109 mil toneladas em 2022 (IBGE, 2024). No presente trabalho, foram encontrados somente três artigos científicos da espécie e dentre esses estudos nenhum descobriu o gene mestre determinante do sexo. A realização de mais pesquisas envolvendo o tema na espécie permitirá a compreensão dos mecanismos de determinação e diferenciação do sexo e facilitará o controle sexual da reprodução, a melhoria da eficiência da seleção de reprodutores e o cultivo monossexuado

(Varela et al., 2021). A obtenção de populações 100% fêmeas é atraente para a produção do tambaqui devido a presença de dimorfismo sexual em que as fêmeas crescem mais rápido que os machos (Almeida et al., 2016).

A análise bibliométrica também demonstrou a quantidade de publicações por ano. A queda nos artigos publicados em 2023 pode ter ocorrido devido ao mês em que os documentos foram recuperados (julho) e por causa da Covid-19 no mundo, que ocasionou atrasos e restrições em atividades de pesquisa e administrações devido ao bloqueio de instituições.

Outro resultado importante obtido com a análise bibliométrica foram as palavras-chaves. A partir delas, foi possível verificar a evolução das pesquisas sobre a determinação do sexo de peixes ao longo dos anos. Entre 2008 e 2010, as principais palavras-chaves foram *Sry*, *Dmy*, região determinante e camundongo. O *Sry* é um gene necessário para a determinação do sexo masculino em mamíferos e está localizado na região distal do braço curto do cromossomo Y. A descoberta deste gene ocorreu em 1990 e foi um marco importante para compreensão da determinação do sexo e do subsequente desenvolvimento sexual dos vertebrados (Sinclair et al., 1990). Em 2002, foi descoberto que em medaka (*Oryzias latipes*) o gene de determinação do sexo ligado ao Y é o *Dmy* (Matsuda et al., 2003) e nos anos seguintes foram feitos mais estudos para compreender SD no gênero *Oryzias* (Devlin & Nagahama, 2022). A partir de 2015, as pesquisas mostraram uma tendência em abordagens que estudam o transcriptoma, a evolução cromossômica, o estresse, o cortisol e a plasticidade, e consideram as possíveis consequências das mudanças climáticas globais. A investigação relacionada a esses temas é importante e mais atual porque o estresse nas mudanças da temperatura, pH, salinidade, presença de substâncias, como bisfenol, fadrozole e nonilfenol, no ambiente aquático podem aumentar o cortisol dos peixes e conseqüentemente alterar a proporção sexual dos indivíduos (Delbes et al., 2022).

Dentre os 1.539 documentos encontrados no PubMed, um total de 413 espécies foram estudadas. As espécies mais estudadas foram medaka (*Oryzias latipes*) (131), peixe-zebra (*Danio rerio*) (114) e tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) (75). Estas três espécies são amplamente utilizadas em estudos de biologia e desenvolvimento devido às suas características como, rápido desenvolvimento, tamanho pequeno, genes conservados, entre outros, caracterizando-os como organismos modelo. Medaka é uma das espécies mais investigadas entre os vertebrados não mamíferos no que diz respeito à determinação e diferenciação sexual (Kang et al., 2017). Já o peixe zebra tem sido usado há décadas como organismo modelo para estudar diversos processos biológicos, no entanto, a compreensão atual dos mecanismos

determinantes do sexo ainda não foram completamente compreendidos (Kossack & Draper, 2019). A tilápia do Nilo desempenha um papel global significativo na produção comercial de aquicultura. Estudos que sequenciaram o genoma e caracterizaram transcriptomas gonadais em tilápia geraram informações extremamente relevantes para avanços nas pesquisas de determinação/diferenciação do sexo desses indivíduos (Brawand et al., 2015; Tao et al., 2013). As espécies *O. latipes*, *D. rerio* e *O. niloticus* servem como excelentes sistemas modelo para investigar a diferenciação sexual dos teleósteos e mamíferos, uma vez que as semelhanças e diferenças entre a expressão gênica das gônadas destas três espécies em comparação com os mamíferos sugerem funções conservadas durante a diferenciação sexual gonadal dos vertebrados (Adhish & Manjubala, 2023; Bagheri-Fam et al., 2010; Luo et al., 2015; Siegfried, 2010).

No mundo são produzidas 313 espécies de peixes, sendo que o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) representou 32,6% da aquicultura marinha e costeira de todas as espécies de peixes ósseos em 2020 (FAO, 2022). Somente 15 documentos abordavam a determinação do sexo em *S. salar* e os artigos mais relevantes foram publicados recentemente. Kijas et al. (2018) notaram a presença de uma região específica do macho em salmão do Atlântico que indica a presença de um sistema sexual XX/XY. Além disso, Kang et al. (2017) analisaram os níveis de expressão de mRNA de possíveis genes determinantes do sexo e de células germinativas primordiais durante a fertilização até a fase de eclosão.

Dentre os artigos encontrados em todas as espécies 49 desenvolveram ferramentas para identificação ou determinação genética do sexo. Para isso, foram utilizadas várias abordagens moleculares, como RFLP, SSRs, AFLP e RAPD. Estas técnicas têm sido sucessivamente abandonadas devido ao maior tempo de manuseio e custo, resultando em um progresso demorado para identificação de regiões determinantes do sexo. Todavia, as tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (NGS), que apresentam um custo cada vez mais acessível, tem sido amplamente utilizada com sucesso para encontrar marcadores sexo específico, como os SNPs (Gong et al., 2022).

Os periódicos que mais publicaram foram “General and Comparative Endocrinology”, “Journal of Fish Biology”, e “PLoS One”. O primeiro publica artigos sobre complexidades dos sistemas endócrinos de vertebrados e invertebrados nos níveis de análise molecular, celular e do organismo. O segundo aborda todos os aspectos da biologia dos peixes, a sua exploração e a sua importância para a sociedade humana. Enquanto o último periódico aborda conteúdos de forma mais abrangente. As fontes mais citadas na análise de citação foram “General and Comparative Endocrinology”, “Aquaculture” e “Nature”. “Aquaculture”,

como o nome sugere, publica e disponibiliza contribuições científicas relacionadas à aqüicultura enquanto a “Nature” é uma fonte multidisciplinar de grande notoriedade à nível mundial.

Souza et al. (2024) realizaram um estudo cienciométrico com 80 documentos que abordaram a determinação do sexo em peixes e os autores tiveram ênfase na espécie pirarucu (*Arapaima gigas*). No entanto, era necessária uma pesquisa complementar que abrangesse um maior número de artigos e realizasse análises adicionais. No presente trabalho, foram avaliados 1.539 artigos e foi feito um estudo bibliométrico que utilizou técnicas avaliativas (medidas de produtividade e de impacto, como artigos acadêmicos publicados por ano, número de artigos por autor e número de citações) e técnicas relacionais (análises de cocitação, coautoria, copalavras e acoplamento bibliográfico (Koseoglu et al., 2016)).

O estudo bibliométrico pode apresentar viés em diferentes etapas das análises, como na seleção dos artigos, nas citações e nas palavras-chaves. O VOSviewer analisa arquivos oriundos de cinco banco de dados (Web of Science, Scopus, Dimensions, Lens e PubMed) e o número de artigos relacionados ao mesmo tema frequentemente difere entre eles. No presente estudo foi utilizado o PubMed. Esse banco de dados encontrou maior quantidade de documentos sobre a determinação do sexo em peixes quando comparado ao Scopus e o Dimensions.

Em relação ao viés do estudo bibliométrico envolvendo as citações, artigos relevantes podem não ter sido citados com frequência porque os periódicos ou livros escolhidos para publicação são locais ou regionais, além disso o idioma escolhido pode ter pequena abrangência e os documentos podem ter sido divulgados recentemente. O acesso (aberto ou fechado) do artigo também influencia nessa questão. Já as palavras-chaves escolhidas podem não incluir toda a literatura (McManus et al., 2023a). Apesar dessas possíveis limitações, esta análise bibliométrica fornece uma visão geral básica mundial de publicações sobre determinação do sexo em peixes. Essas informações podem ajudar a direcionar estudos futuros. A China e os Estados Unidos têm contribuído bastante no desenvolvimento de pesquisas envolvendo o tema, e o Brasil foi o país da América Latina que mais publicou. Medaka, tilápia do Nilo e peixe zebra foram as espécies mais estudadas. A partir desses resultados este artigo mostra a necessidade de fortalecer estudos em áreas menos favorecidas e de realizar mais pesquisas com outras espécies economicamente importantes como o salmão do Atlântico e o tambaqui.

REFERÊNCIAS

- Adhish, M., & Manjubala, I. (2023). Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases—A review of models. In *Heliyon* (Vol. 9, Issue 3). Elsevier Ltd.
- Almeida, F. L., Lopes, J. S., Crescencio, R., Izel, A. C. U., Chagas, E. C., & Boijink, C. (2016). Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, *452*, 224–232.
- Bagheri-Fam, S., Sinclair, A. H., Koopman, P., & Harley, V. R. (2010). Conserved regulatory modules in the Sox9 testis-specific enhancer predict roles for SOX, TCF/LEF, Forkhead, DMRT, and GATA proteins in vertebrate sex determination. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *42*(3), 472–477.
- Bezault, E., Clota, F., Derivaz, M., Chevassus, B., & Baroiller, J. F. (2007). Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture*, *272*(SUPPL. 1).
- Brawand, D., Wagner, C. E., Li, Y. I., Malinsky, M., Keller, I., Fan, S., Simakov, O., Ng, A. Y., Lim, Z. W., Bezault, E., Turner-Maier, J., Johnson, J., Alcazar, R., Noh, H. J., Russell, P., Aken, B., Alföldi, J., Amemiya, C., Azzouzi, N., ... Di Palma, F. (2015). The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature*, *513*(7518), 375–381.
- Chen, J., Zhu, Z., & Hu, W. (2022). Progress in research on fish sex determining genes. In *Water Biology and Security* (Vol. 1, Issue 1). Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences.
- Consuegra, S., & Rodríguez López, C. M. (2016). Epigenetic-induced alterations in sex-ratios in response to climate change: An epigenetic trap? *BioEssays*, *38*(10), 950–958.
- Delbes, G., Blázquez, M., Fernandino, J. I., Grigorova, P., Hales, B. F., Metcalfe, C., Navarro-Martín, L., Parent, L., Robaire, B., Rwigemera, A., Van Der Kraak, G., Wade, M., & Marlatt, V. (2022). Effects of endocrine disrupting chemicals on gonad development: Mechanistic insights from fish and mammals. *Environmental Research*, *204*.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2022). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences.
- Embrapa. (2024). *Aquicultura*. <https://www.embrapa.br/visao-de-futuro/trajetoria-do-agro/desempenho-recente-do-agro/aquicultura>

Eschmeyer's Catalog of Fishes. (2024).

<https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022.

Geffroy, B., Besson, M., Sanchez-Baizan, N., Clota, F., Goikoetxea, A., Sadoul, B., Ruelle, F., Blanc, M.-O., Parrinelo, H., Hermet, S., Blondeau-Bidet, E., Pratlong, M., Piferrer, F., Vandeputte, M., & Allaç, F. (2021). *Unraveling the genotype by environment interaction in a thermosensitive fish with a polygenic sex determination system DEVELOPMENTAL BIOLOGY*. 118, 2112660118.

Gong, J., Li, B., Zhao, J., Zhou, Z., Ke, Q., Zhu, Q., Xu, D., Zhou, T., & Xu, P. (2022). Sex-Specific Genomic Region Identification and Molecular Sex Marker Development of Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Marine Biotechnology*, 24(1), 163–173.

He, Y., Fang, J., Xue, L., Wu, J., Dawar, F. U., & Mei, J. (2017). Potential contributions of heat shock proteins and related genes in sexual differentiation in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(2), 465–475.

Hoga, C. A., Reche, K. V. G., Almeida, F. L., Reis, V. R., Cordeiro, R. P., Anadón, A., & Reyes, F. G. R. (2019). Development and validation of an analytical method for the determination of 17 β -estradiol residues in muscle of tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) by LC-MS/MS and its application in samples from a fish sexual reversion study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1128.

IBGE. (2024). Produção da Pecuária Municipal 2023. *Imprensa Oficial*.

Kang, Y., Guan, G.-J., & Hong, Y.-H. (2017). Insights of sex determination and differentiation from medaka as a teleost model. *Hereditas*, 39(6), 441–454.

Kijas, J., McWilliam, S., Naval Sanchez, M., Kube, P., King, H., Evans, B., Nome, T., Lien, S., & Verbyla, K. (2018). Evolution of Sex Determination Loci in Atlantic Salmon. *Scientific Reports*, 8(1).

Koseoglu, M. A., Rahimi, R., Okumus, F., & Liu, J. (2016). Bibliometric studies in tourism. *Annals of Tourism Research*, 61, 180–198.

Kossack, M. E., & Draper, B. W. (2019). Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*). In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 134, pp. 119–149). Academic Press Inc.

Lobo, I. K. C., Nascimento, Á. R. do, Yamagishi, M. E. B., Guiguen, Y., Silva, G. F. da, Severac, D., Amaral, A. da C., Reis, V. R., & Almeida, F. L. de. (2020). Transcriptome of tambaqui *Colossoma macropomum* during gonad differentiation: Different molecular signals leading to sex identity. *Genomics*, 112(3), 2478–2488.

Luo, D., Liu, Y., Chen, J., Xia, X., Cao, M., Cheng, B., Wang, X., Gong, W., Qiu, C., Zhang, Y., Ki Cheng, C. H., Zhu, Z., & Hu, W. (2015). Direct production of XYDMY- sex reversal female medaka (*Oryzias latipes*) by embryo microinjection of TALENs. *Scientific Reports*, 5.

- Martínez, P., Viñas, A. M., Sánchez, L., Díaz, N., Ribas, L., & Piferrer, F. (2014). Genetic architecture of sex determination in fish: Applications to sex ratio control in aquaculture. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 5, Issue SEP). Frontiers Media S.A.
- Mas-Tur, A., Roig-Tierno, N., Sarin, S., Haon, C., Segó, T., Belkhouja, M., Porter, A., & Merigó, J. M. (2021). Co-citation, bibliographic coupling and leading authors, institutions and countries in the 50 years of Technological Forecasting and Social Change. *Technological Forecasting and Social Change*, 165.
- Matsuda, M., Sato, T., Toyazaki, Y., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2003). *Oryzias latipes* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zoological Science*, 20(2), 159–161.
- McManus, C., Pimentel, F., Pimentel, D., Sejian, V., & Blackburn, H. (2023a). Bibliographic mapping for heat tolerance in pigs and poultry. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 55, Issue 4). Springer Science and Business Media B.V.
- McManus, C., Pimentel, F., Pimentel, D., Sejian, V., & Blackburn, H. (2023b). Bibliographic mapping of heat tolerance in farm animals. In *Livestock Science* (Vol. 269). Elsevier B.V.
- Perianes-Rodriguez, A., Waltman, L., & van Eck, N. J. (2016). Constructing bibliometric networks: A comparison between full and fractional counting. *Journal of Informetrics*, 10(4), 1178–1195.
- Rajendiran, P., Jaafar, F., Kar, S., Sudhakumari, C., Senthilkumaran, B., & Parhar, I. S. (2021). Sex determination and differentiation in teleost: Roles of genetics, environment, and brain. In *Biology* (Vol. 10, Issue 10). MDPI.
- Shinomiya, A., Otake, H., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2010). Inherited XX sex reversal originating from wild medaka populations. *Heredity*, 105(5), 443–448.
- Siegfried, K. R. (2010). In search of determinants: Gene expression during gonadal sex differentiation. In *Journal of Fish Biology* (Vol. 76, Issue 8, pp. 1879–1902).
- Sinclair, A., Berta, P., Palmer, M., Hawkins, R., Griffiths, B., & Smith, M. (1990). A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature*.
- Souza, A. F., Costa, H. C. C., Castro, J. da S., Cajado, F. J. L., Carreiro, C. R. P., Teixeira, E. G., & Costa, J. M. (2024). Panorama das pesquisas sobre a determinação sexual em peixes, com ênfase sobre o pirarucu: Uma análise cienciométrica. *Research, Society and Development*, 13(2)
- Tao, W., Yuan, J., Zhou, L., Sun, L., Sun, Y., Yang, S., Li, M., Zeng, S., Huang, B., & Wang, D. (2013). Characterization of Gonadal Transcriptomes from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Reveals Differentially Expressed Genes. *PLoS ONE*, 8(5).
- Taslina, K., Wehner, S., Taggart, J. B., De Verdal, H., Benzie, J. A. H., Bekaert, M., McAndrew, B. J., & Penman, D. J. (2020). Sex determination in the GIFT strain of tilapia is controlled by a locus in linkage group 23. *BMC Genetics*, 21(1).

- Valdivieso, A., Wilson, C. A., Amores, A., da Silva Rodrigues, M., Nóbrega, R. H., Ribas, L., Postlethwait, J. H., & Piferrer, F. (2022). Environmentally-induced sex reversal in fish with chromosomal vs. polygenic sex determination. *Environmental Research*, 213.
- Valenzuela, N., Literman, R., Neuwald, J. L., Mizoguchi, B., Iverson, J. B., Riley, J. L., & Litzgus, J. D. (2019). Extreme thermal fluctuations from climate change unexpectedly accelerate demographic collapse of vertebrates with temperature-dependent sex determination. *Scientific Reports*, 9(1).
- Van Eck, N. J., & Waltman, L. (2014). Visualizing Bibliometric Networks. In *Measuring Scholarly Impact* (pp. 285–320). Springer International Publishing.
- Varela, E. S., Bekaert, M., Ganeco-Kirschnik, L. N., Torati, L. S., Shiotsuki, L., de Almeida, F. L., Villela, L. C. V., Rezende, F. P., da Silva Barroso, A., de Freitas, L. E. L., Taggart, J. B., & Migaud, H. (2021). A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*. *BMC Genomics*, 22(709).
- Wang, M., Chen, L., Zhou, Z., Xiao, J., Chen, B., Huang, P., Li, C., Xue, Y., Liu, R., Bai, Y., Yan, M., Hu, S., Dai, Y., Yang, C., Zou, X., Jiang, Z., Feng, J., Zhou, T., & Xu, P. (2023). Comparative transcriptome analysis of early sexual differentiation in the male and female gonads of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 563.
- Wang, Q., Liu, K., Feng, B., Zhang, Z., Wang, R., Tang, L., Li, W., Li, Q., Piferrer, F., & Shao, C. (2019). Transcriptome of Gonads From High Temperature Induced Sex Reversal During Sex Determination and Differentiation in Chinese Tongue Sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Frontiers in Genetics*, 10.
- Yamamoto, Y., Hattori, R. S., Patiño, R., & Strüssmann, C. A. (2019). Environmental regulation of sex determination in fishes: Insights from Atheriniformes. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 134, pp. 49–69). Academic Press Inc.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DETERMINANTES DO SEXO EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DETERMINANTES DO SEXO EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Nayelle Meyre Lisboa Silva¹, Patrícia Ianella², Alexandre Rodrigues Caetano³

1 Bióloga/ Doutoranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

2 Bióloga/ Doutora – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

3 Zootecnista/ Doutor – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é a espécie nativa mais importante da piscicultura brasileira. Essa espécie apresenta dimorfismo sexual de crescimento em favor das fêmeas, o que torna atraente o cultivo de populações monosssexuais de 100% fêmeas. Para que se possa aplicar essa estratégia, é necessário compreender os mecanismos de determinação do sexo do tambaqui. O presente estudo fez análises de associação genômica ampla (GWAS) com o intuito de identificar regiões genômicas associadas ao sexo no *C. macropomum*. Inicialmente, 684 tambaquis reprodutores (325 fêmeas e 359 machos) de sete produtores brasileiros, que já haviam sido genotipados com Tambaplus Parentesco (96 SNPs), foram utilizados para seleção de 192 amostras com relações de parentesco mais baixas. Essa seleção foi bem-sucedida, uma vez que as análises de IBD e PCA indicaram a redução da estimativa de parentesco e da estruturação populacional das amostras. Após a seleção, as 192 amostras foram genotipadas

com o painel de média densidade Axiom SerraSNP (29.575 SNPs). Os dados resultantes da genotipagem foram analisados com SVS Golden Helix para controle de qualidade (CQ) e subsequente realização de GWAS. O CQ manteve amostras e SNPs com taxa de chamada $>0,90$, e SNPs, bialélicos, com $MAF > 0,05$. Os dados de 21.447 SNPs e dois subconjuntos de amostras de 187 e de 151 amostras permaneceram disponíveis para GWAS. Em seguida, foi feito CQ adicional com base nas estimativas de desequilíbrio de ligação (LD) ($r^2 < 0,50$) para realização das análises de IBD e PCA com 187 amostras e 16.855 SNPs. A análise de GWAS identificou cinco regiões genômicas associadas ao sexo no tabaqui. Os marcadores apresentaram uma precisão de 65 a 88% para prever o sexo corretamente. Os genótipos de todos os SNPs indicaram que os genótipos masculinos eram heterozigotos (GT), enquanto as fêmeas eram homozigotas (TT), indicando um sistema genético XX/XY. Diante de todos os resultados apresentados, pode-se afirmar que o presente estudo teve descobertas iniciais úteis para o desenvolvimento de uma ferramenta molecular para determinação do sexo do tabaqui, no entanto, pesquisas complementares precisam ser realizadas para encontrar o gene mestre determinante do sexo (MSD).

PALAVRAS-CHAVES: Análise de Associação Genômica Ampla; Axiom SerraSNP; Identidade por Descendência; XX/XY.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS DETERMINING SEX IN TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Tambaqui, *Colossoma macropomum*, is the most important native species for Brazilian fish farming. This species presents sexual dimorphism in growth in favor of females, which makes the production of monosexual populations of 100% females attractive. However, to apply this strategy, it is necessary to understand the mechanisms of sex determination of tambaqui. We have performed Genome-Wide Association Studies (GWAS) to identify genomic regions associated with sex in *C. macropomum*. Initially, 684 sexually mature tambaquis (325 females and 359 males) from seven Brazilian producers, which had already been genotyped with panel TambaPlus Relationship (96 SNPs), were used to select 192 samples with lower kinship relationships. This selection was successful, since the IBD and PCA analyses indicated a reduction in the estimated kinship and population structure of the samples. After selection, the 192 samples were genotyped with the Axiom SerraSNP medium-density panel (29,575 SNPs). The resulting genotyping data were analyzed with SVS Golden Helix for Quality Control (QC) and subsequent GWAS. QC retained samples and SNPs with call rates >0.90 , and biallelic SNPs with MAF >0.05 . Data from 21,447 SNPs and two sample subsets of 187 and 151 samples remained available for GWAS. Then, additional QC was performed based on linkage disequilibrium (LD) estimates ($r^2 < 0.50$) to perform IBD and PCA analyses with 187 samples and 16,855 SNPs. The GWAS analysis identified five genomic regions associated with sex in tambaqui. The markers showed an accuracy of 65 to 88% to correctly predict sex. The genotypes of all SNPs indicated that the male genotypes were heterozygous (GT), while the

females were homozygous (TT), indicating an XX/XY genetic system. Given all the results presented, it can be stated that the present study had useful initial discoveries for the development of a molecular tool for sex determination of tambaqui; however, additional research needs to be carried out to find the master sex-determining gene (MSD).

KEYWORDS: Axiom SerraSNP; Genome-Wide Association Study; Identity By Descent; XX/XY.

3.1 INTRODUÇÃO

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), ocorre naturalmente nas bacias do rio Amazonas e Orinoco e vem sendo a espécie nativa mais cultivada no Brasil nos últimos anos. Em 2022, a sua produção foi superior a 109 mil t, o que corresponde a 15% da piscicultura nacional. Além disso, *C. macropomum* e seus híbridos, tambacu (fêmea *C. macropomum* × macho *Piaractus mesopotamicus*) e tambatinga (fêmea *C. macropomum* × macho *P. brachypomus*), compõem a terceira categoria de peixe mais produzida no país (45.193 t) (IBGE, 2024).

O *C. macropomum* é uma espécie nativa de relevância, e candidata para os programas de melhoramento genético devido ao alto valor de mercado, reprodução relativamente fácil e bem controlada em cativeiro, boa adaptação à vários sistemas de criação, hábito alimentar onívoro e rápido crescimento (Pincinato & Asche, 2016; Saint-Paul, 2017; Gallani, & Pilarski, 2016). Essa espécie tem dimorfismo sexual associado ao crescimento em que as fêmeas podem ser 16% mais pesadas que os machos quando atingem maturação sexual (Almeida et al., 2016). O crescimento superior observado nas fêmeas tem potencial para ser explorado comercialmente, em sistemas de produção monosexo, onde populações 100% fêmeas poderão ser geradas com o uso de tratamentos hormonais (com estrógeno) na fase larval (Reis & Almeida, 2019), ou de cruzamentos dirigidos, de peixes que passaram por reversão sexual com hormônios (Ex: fêmeas XX, tratadas com testosterona para se tornarem machos fenotípicos, cruzadas com fêmeas normais). O uso de hormônio (estrógeno) para reversão direta de grandes números de larvas destinadas à produção de alevinos para a engorda e abate tem fatores negativos que devem ser considerados, como a eventual exposição dos trabalhadores aos hormônios durante o processo de reversão; a descarga de grandes volumes de hormônios no meio ambiente; e a eventual percepção negativa do público consumidor em ingerir alimentos

tratados com esteroides sexuais (Varela et al., 2021). Sendo assim, a estratégia de produção de populações monosexo, a partir de cruzamentos de machos fenotípicos XX, com fêmeas XX torna-se uma opção atrativa para o mercado. No entanto, para que se possa aplicar essa estratégia, é necessário que se desenvolva testes moleculares simples, de alta acurácia, para identificar o sexo genotípico de peixes submetidos a tratamentos hormonais com testosterona de forma precisa.

Os mecanismos de determinação genética em peixes teleósteos são geralmente definidos por um gene crítico localizado em um cromossomo sexual ou por múltiplos genes situados tanto em autossomos como em cromossomos sexuais (Devlin & Nagahama, 2002). Dentre os principais sistemas de determinação do sexo observados em peixes, encontram-se o sistema XX/XY (fêmea/macho) e o sistema ZZ/ZW (macho/fêmea), além das suas variantes XX/XO, XX/XY₁Y₂, X₁X₂X₁X₂/ X₁X₂Y, X₁X₂X₁X₂/X₁X₂X₁, ZZ/ZO e ZZ/ZW₁W₂, sendo que o heteromorfismo do cromossomo sexual não pode ser observado em muitas das espécies já estudadas (Eisbrenner, 2013). Análises citogenéticas realizadas com tambaqui mostraram que o número diploide de cromossomos da espécie é $2n = 54$, e assim como foi observado na maioria das espécies de teleósteos, nenhum heteromorfismo foi encontrado nos cromossomos sexuais (Hashimoto et al., 2014).

Um mapa de ligação genético gerado com 14.805 SNPs foi utilizado para identificar marcadores ligados ao sexo no tambaqui (Varela et al., 2021). O estudo, realizado com famílias estruturadas, identificou o mapeamento da região associada ao sexo em um único cromossomo sugerindo um sistema heterogamético masculino XX/XY. O estudo de associação do genoma completo (GWAS) identificou quatro polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) mais informativos ligados ao sexo, que foram identificados no grupo de ligação 26 e validados em indivíduos sexados com acurácia variando entre 90 e 96%. Uma acurácia de 100% na identificação do sexo não foi alcançada, ou seja, ainda não está claro quais variantes causadoras putativas específicas estão envolvidas na regulação do sexo no tambaqui, nem mesmo o gene responsável por determinar o sexo da espécie (MSD – *Master Sex Determination*). O presente estudo teve como objetivo identificar regiões genômicas associadas ao sexo no *C. macropomum*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Seleção das amostras

Dados genotípicos de 684 reprodutores de tambaquis (325 fêmeas e 359 machos) de sete produtores brasileiros, amostrados entre 2019 e 2022, genotipados com o painel de 96 SNPs Tambaplus Parentesco em um estudo prévio (Tabela 3.1) foram utilizados para selecionar animais com parentesco reduzido que compuseram a amostragem do presente estudo.

Tabela 3.1: Amostras de produtores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizados no estudo.

Produtor	N° de amostras	
	Fêmeas	Machos
1	122	192
2	102	74
3	9	12
4	16	32
5	15	10
6	15	15
7	46	24
Total	325	359

Os sete produtores são da região norte e de três estados: Tocantins (1) Amazonas (3 e 4) e Rondônia (2, 5, 6 e 7). A coleta das nadadeiras foi feita pelos produtores nas fazendas, inicialmente, para controle zootécnico. Em seguida, o material foi enviado para Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) para realização de estudos com as ferramentas

moleculares desenvolvidas pela equipe do laboratório em que se conduziu o estudo. Esse material foi doado para a instituição para ser utilizado em pesquisas posteriores. Todos os procedimentos experimentais e de manuseio de peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa.

O controle de qualidade das 684 amostras e dos 96 SNPs utilizados inicialmente, a análise de identificação por descendência (IBD) e a análise das componentes principais (PCA) foram realizados com o software SNP e Suite Variation v8.x (Golden Helix). O controle de qualidade eliminou nove SNPs e 134 amostras com Taxa de Chamada $<0,90$, restando 87 SNPs e 550 amostras para as análises subsequentes. O IBD foi utilizado para avaliar o parentesco dos indivíduos para seleção de 192 amostras (96 fêmeas e 96 machos) com relações de parentesco mais baixas. Foram selecionadas amostras dos sete produtores uma vez que as maiores estimativas de parentesco estavam presentes, principalmente, entre as amostras dos mesmos produtores. PCA e IBD também foram usados para avaliar a eficiência da seleção das amostras por meio da comparação dos dois subconjuntos de indivíduos (550 e 192).

3.2.2 Extração de DNA e genotipagem com painel de SNP de média densidade

As 192 amostras selecionadas tiveram DNA extraído com um método adaptado por Boyce et al. (1989), utilizando Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB). A qualidade e quantidade de DNA obtidos foram avaliados usando eletroforese em gel de agarose 1% e espectrofotometria com NanoDrop™ 8000. As amostras de DNA foram genotipadas com o painel de média densidade Axiom SerraSNP por um provedor de serviços comerciais (Neogen-Geneseek, Lincoln, NE, USA).

3.2.3 Estruturação populacional e parentesco

O controle de qualidade de 187 amostras (cinco não passaram pelos critérios mínimos de qualidade) e dos 29.575 SNPs do painel foi realizado com o software SNP e Suite Variation v8.x (Golden Helix). Cerca de 6.755 SNPs com Taxa de Chamada $<0,90$ foram descartados do dataset. Além disso, SNPs adicionais foram eliminados com base na MAF média observada ($<0,05$). Os dados de 21.447 SNPs e 187 indivíduos (96 machos e 91 fêmeas) permaneceram disponíveis para as análises de estudo de associação genômica ampla – GWAS. As análises de GWAS também foram feitas com um subgrupo de 157 amostras, oriundas de uma filtragem que excluiu indivíduos mais aparentados do mesmo sexo. Foi realizado um

controle de qualidade adicional com base nas estimativas de desequilíbrio de ligação (LD), considerando um tamanho de janela de 50 SNPs e incrementos de janela de 5 SNPs, para eliminar marcadores com $r^2 < 0,50$. Essa última filtragem foi feita para realização das análises de identificação de parentesco (IBD – *Identity by Descendent*) e análise das componentes principais (PCA) utilizando 187 amostras e 16.855 SNPs.

3.2.4 Obtenção do mapa genético

Inicialmente, os *scaffolds* da montagem do genoma referência do tabaqui (NCBI: GCF_904425465.1) foram fragmentados em 1.684 *contigs*. Em seguida, o programa bbmap (Bushnell, 2014) foi utilizado para alinhar os *contigs* com a sequência das sondas dos 29.575 SNPs genotipados com Axiom SerraSNP. Esse alinhamento possibilitou a obtenção de *scaffolds* maiores compostos pela sequência das sondas e pelos seus flancos. A profundidade do alinhamento da leitura foi averiguada com o programa ngstat dos pacotes purge_dups. Para identificar potenciais *contigs* de DNA exógeno (organelas, contaminantes) presentes no genoma referência do NCBI, foi feita uma inspeção usando os métodos blobtools. Após tais análises, foram removidos *contigs* que tiveram similaridade com sequências de DNA exógeno e que apresentaram cobertura baixa, alta e diploide.

As presenças de potenciais junções quiméricas entre os *contigs* foram avaliadas usando análise de colinearidade da região genômica contra um mapa de ligação de alta densidade disponível para o tabaqui (Nunes et al., 2017). As etiquetas de sequências (GBS) colocadas nos grupos de ligação no mapa genético foram alinhadas aos *contigs* usando o programa BLAT (Kent, 2002). Os alinhamentos foram avaliados para identificar a provável localização de origem nas etiquetas de sequência no genoma referência. A colinearidade entre sequências nos *contigs* foi avaliada usando o programa ALLMAPS (Tang et al., 2015). A realização dessas etapas permitiu que as sequências expandidas das sondas dos SNPs do AxiomSerraSNP fossem ancoradas no mapa genético de alta densidade do tabaqui para obtenção do genoma a nível cromossômico. Com isso, foi possível posicionar 23.554 sondas em 27 grupos de ligação.

3.2.5 Estudo de associação genômica ampla - GWAS

O GWAS foi feito utilizando o software SNP e Suite Variation v8.x (Golden Helix). O fenótipo binário para determinação do sexo foi registrado como “0” para fêmea e “1”

para macho. Foi utilizado o modelo linear misto de locus único (EMMA – *Efficient Mixed Model Association*) e modelo genético dominante. Como não havia informações do *pedrigree*, uma matriz de parentesco foi calculada usando todos os marcadores. A matriz foi utilizada para corrigir eventuais efeitos de confundimento oriundos de subestruturas das amostras, no nível populacional e de parentesco entre os indivíduos. O modelo usado tem o seguinte formato:

$$Y = X\beta + Z\mu + \epsilon$$

onde:

Y é o vetor dos fenótipos (sexo)

X é uma matriz de efeitos fixos composta pelos genótipos em todos os marcadores

β é o vetor de incidência dos efeitos fixos (marcadores)

Z é a matriz dos coeficientes de identidade estimados entre todos os indivíduos

μ é o vetor dos coeficientes dos efeitos aleatórios

ϵ é o efeito dos resíduos

Após a realização do GWAS, os genótipos dos marcadores associados à determinação do sexo foram averiguados em relação à acurácia, ou seja, foi quantificado o nível de erro entre o genótipo desejado e o genótipo observado.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Seleção das amostras

A seleção das 192 amostras dos sete produtores foi baseada nas menores estimativas de parentesco. A Tabela 3.2 mostra o número de amostras selecionadas para cada produtor e por sexo.

Tabela 3.2: Amostras de produtores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) selecionadas de acordo com a menor estimativa de parentesco.

Produtor	N° de amostras	
	Fêmeas	Machos
1	13	13
2	30	30
3	8	8
4	8	8
5	8	8
6	11	11
7	18	18
Total	96	96

A análise de identificação por descendência (IBD), realizada com os dois subconjuntos de amostras (550 e 192) e com dados filtrados do TambaPlus Parentesco (87SNPs), demonstra que vários indivíduos com valores mais altos de estimativas de parentesco foram excluídos durante a seleção das amostras (Figura 3.1). Antes da seleção, foram observados três grandes grupos de amostras do produtor 1, com as maiores estimativas de IBD entre 0,4 e 0,5 (Figura 3.1A). Após a seleção, não é mais observada a presença desses blocos

de indivíduos com alto nível de parentesco, sendo que somente alguns indivíduos apresentaram estimativas altas (Figura 3.1B).

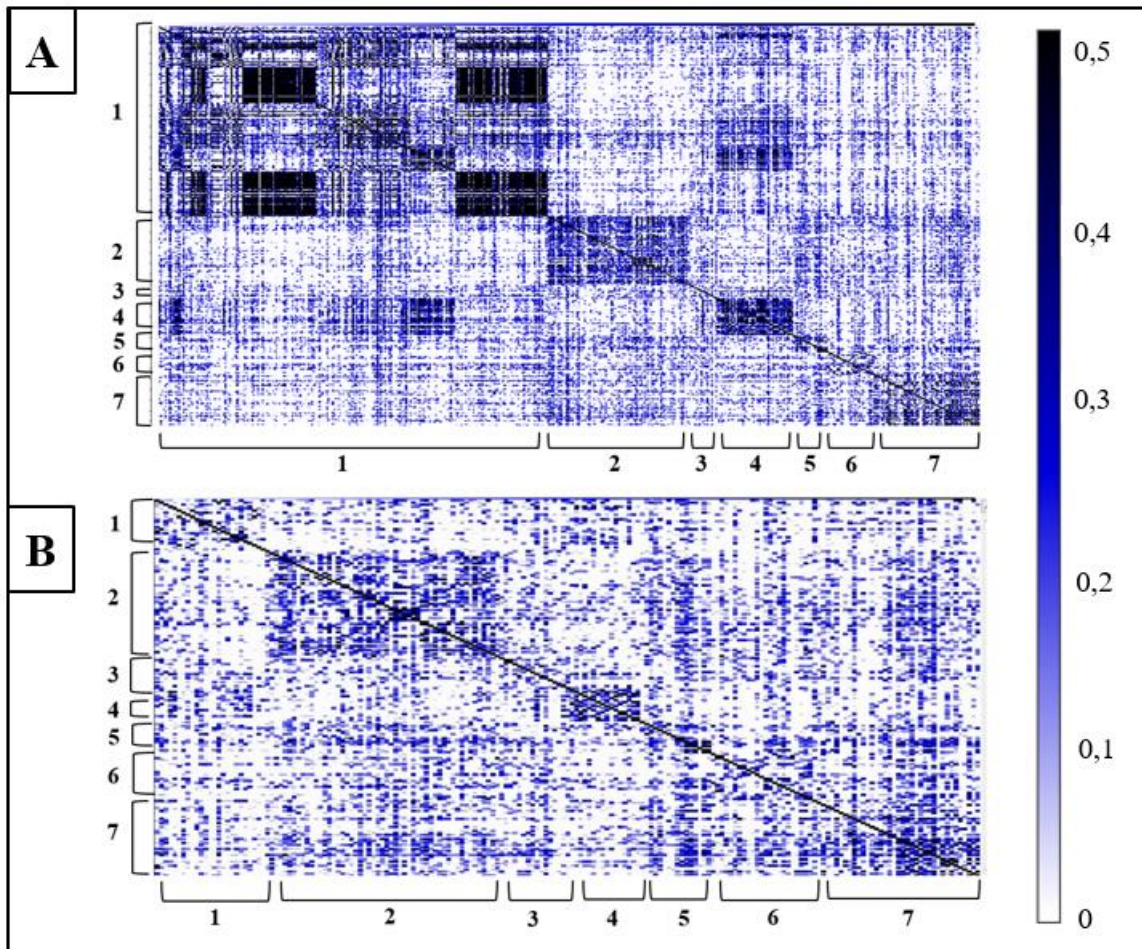


Figura 3.1: Análise de identificação por descendência (IBD) das amostras de todos os produtores estudados, considerando dados controlados de qualidade TambaPlus Parentesco (87SNPs). (A) IBD das 550 amostras de tabaqui analisadas. (B) IBD para 187 amostras com menor relação de parentesco. A escala de cores, que varia entre 0 e 0,5, demonstra a estimativa de parentesco observada entre as amostras e os números presentes nas bordas correspondem aos produtores estudados.

A Figura 3.2 mostra os resultados da PCA considerando as 550 (3.2A) e as 192 amostras (3.2B) de todos os produtores. Na Figura 3.2A há uma subestruturação evidente nas amostras do produtor 1 (destacada em vermelho), o que corrobora com a formação dos blocos observados nas análises de IBD. As 192 amostras selecionadas ficaram dispersas nos quadrantes da PCA, o que evidência diferenciação entre estes indivíduos (3.2B).

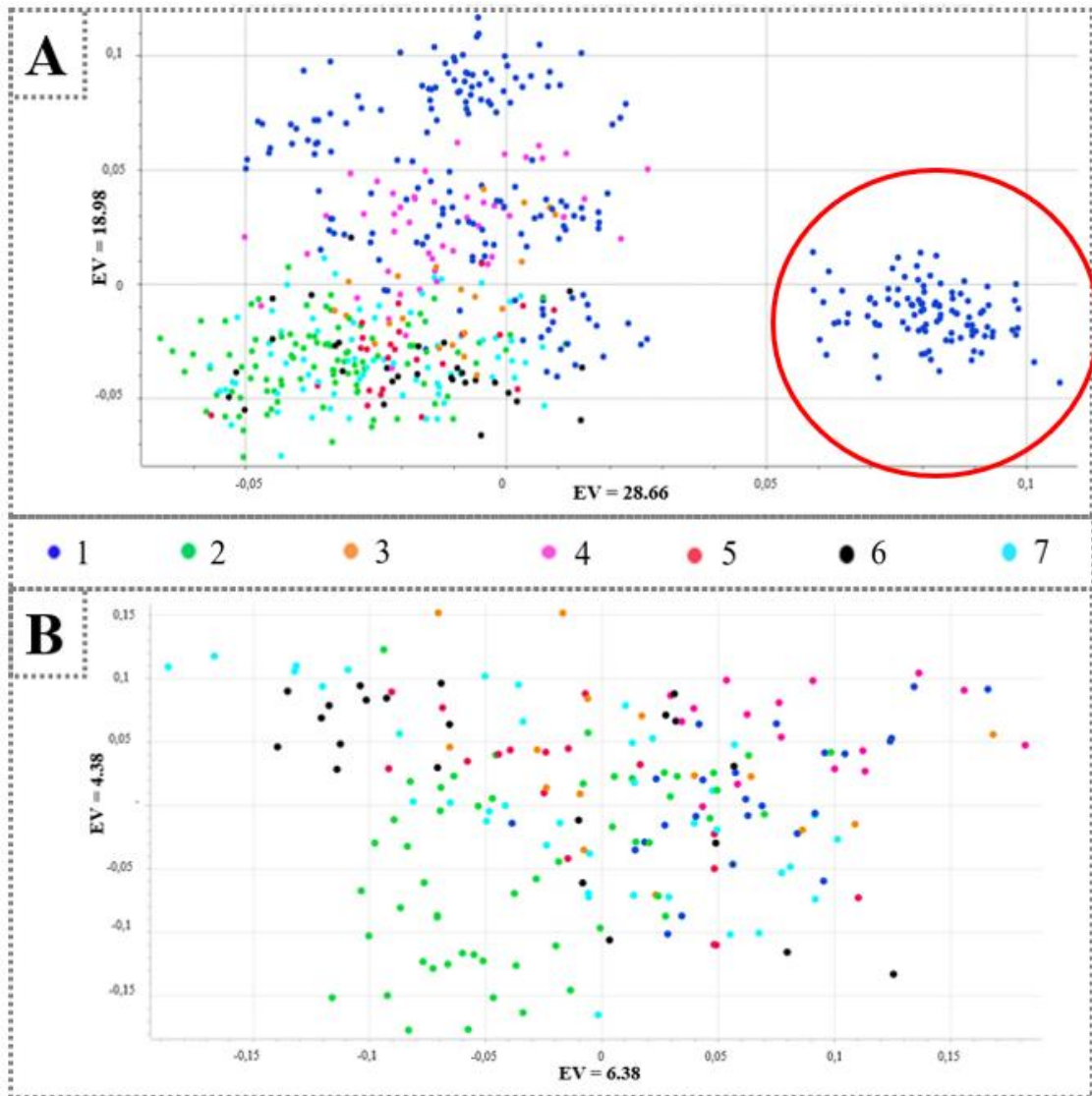


Figura 3.2: Projeção de amostras de todos os produtores de tabaqui estudados, considerando dados controlados de qualidade TambaPlus Parentesco (87SNPs). (A) PCA de 550 amostras de tabaqui e sem seleção de amostras com menor parentesco. A primeira componente explica 28,66% da variação observada e a segunda componente 18,98%. (B) PCA de 192 amostras com menor relação de parentesco. A primeira componente explica 6,38% da variação observada e a segunda componente, 4,38%. EV (*Eigen Value*) indica a porcentagem da variância explicada.

3.3.2 Estruturação populacional e parentesco

A análise de identificação por descendência (IBD), realizada com as 187 amostras e com dados controlados de qualidade Axiom SerraSNP (16.855 SNPs), demonstra a presença de amostras com altas estimativas de parentesco (0,5). Quando o IBD do painel TambaPlus Parentesco (87SNPs) (Figura 3.1B) é comparado com Axiom SerraSNP pode ser

observado que o último apresentou menores estimativas de parentesco em várias amostras, uma vez que valores mais próximos de zero estão mais presentes na Figura 3.3. O painel TambaPlus também indicou que algumas amostras apresentavam altos valores de IBD. Além disso, a correlação entre os valores de IBD estimados com os painéis Axiom SerraSNP e TambaPlus foi de 76%.

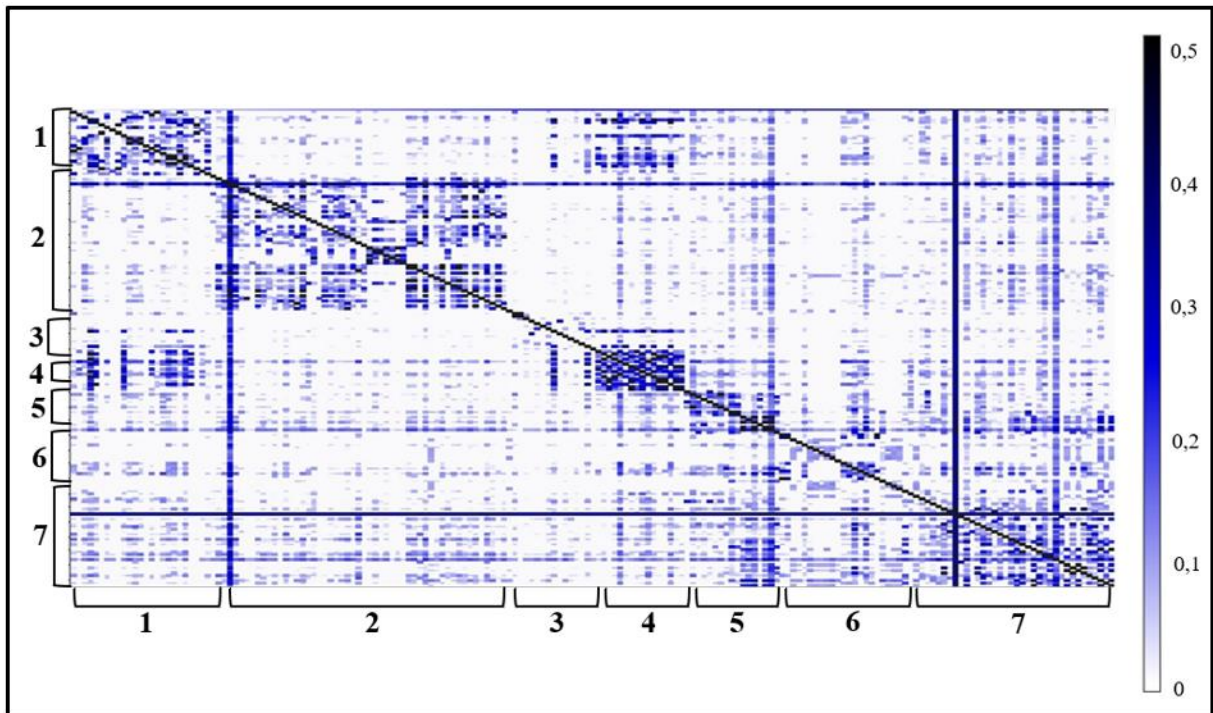


Figura 3.3: Análise de identificação por descendência (IBD) de 187 amostras dos sete produtores estudados considerando dados controlados de qualidade Axiom SerraSNP (16.855 SNPs). A escala de cores, que varia entre 0 e 0,5, demonstra a estimativa de parentesco observada entre as amostras e os números presentes nas bordas correspondem aos produtores estudados.

A Figura 3.4 mostra os resultados da PCA com os dois primeiros componentes principais representando a variação genética. Algumas amostras do produtor 6 e 7 ficaram agrupadas no quadrante superior direito e parte das amostras do produtor 2 ficaram agrupadas na metade inferior da figura. Esses agrupamentos corroboram com o IBD (Figura 3.3), pois alguns indivíduos destes mesmos produtores mostraram altas estimativas de parentesco.

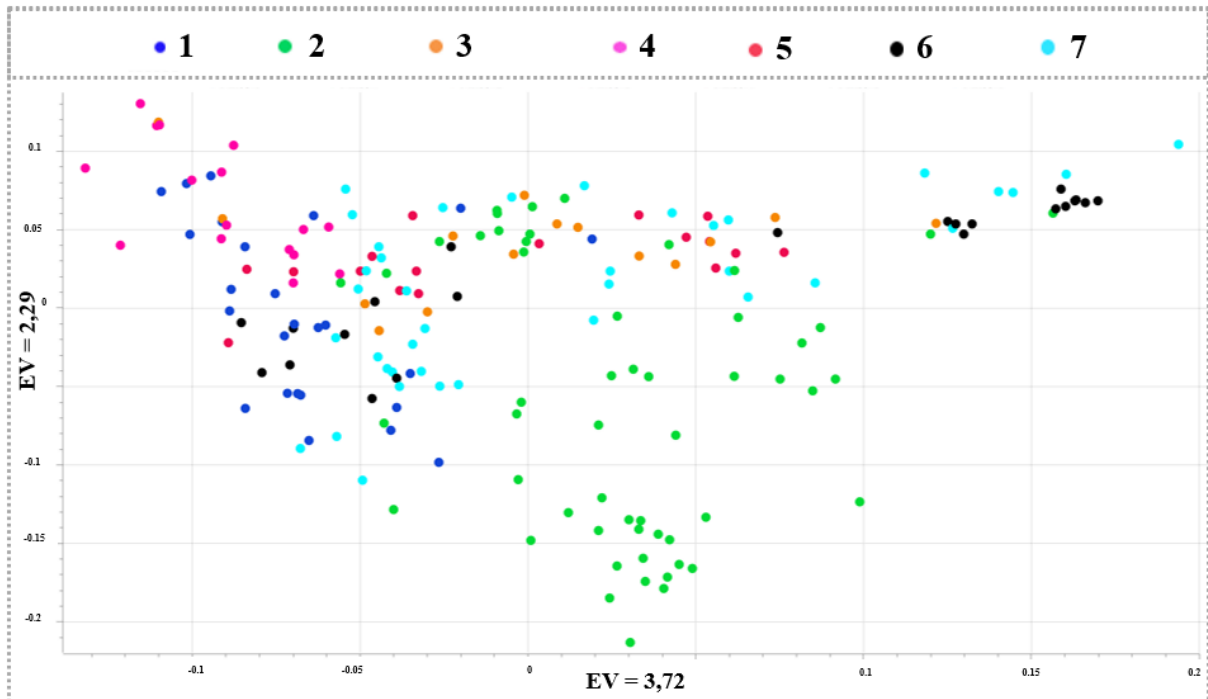


Figura 3.4: PCA de 187 amostras de todos os produtores de tabaqui estudados considerando dados controlados de qualidade Axiom SerraSNP (16.855 SNPs). A primeira componente explica 2,29% da variação observada e a segunda componente, 3,72%. EV (*Eigen Value*) indica a porcentagem da variância explicada.

3.3.3 Estudo de associação genômica ampla – GWAS com painel Axiom SerraSNP

Foram realizadas análises de GWAS com dois conjuntos de amostras diferentes. No primeiro conjunto foi feita uma filtragem complementar para excluir indivíduos do mesmo sexo que eram aparentados. Em seguida, foram utilizados 151 amostras e dados com qualidade controlada Axiom SerraSNP (21.447 SNPs) para verificar a distribuição do locus associado ao sexo em *C. macropomum*. Os SNPs AX-508832278 (GL26: 3.344.373), AX-508825065 (GL26: 2.269.020), AX-508784292 (não mapeado), AX-509111832 (GL26: 2.314.316) e AX-508832170 (GL26: 3.120.423) apresentaram os maiores valores $-\log_{10}(P)$ 22,30, 12,47, 12,23, 9,93 e 6,89 respectivamente, para associação do fenótipo (sexo) com o genótipo (Figura 3.5A e Tabela 3.3). Os cinco marcadores apresentaram acurácia variando entre 65 e 88%.

O segundo conjunto de dados tinha 187 amostras e 21.447 SNPs, ou seja, não foram excluídos indivíduos do mesmo sexo que eram aparentados. Os SNPs que apresentaram os maiores valores de $-\log_{10}(P)$ estão na seguinte ordem: AX-508832278, AX-508825065,

AX-509111832, AX-508784292 e AX-508832170 (Figura 3.5B e Tabela 3.3), enquanto a acurácia variou entre 62 a 87%.

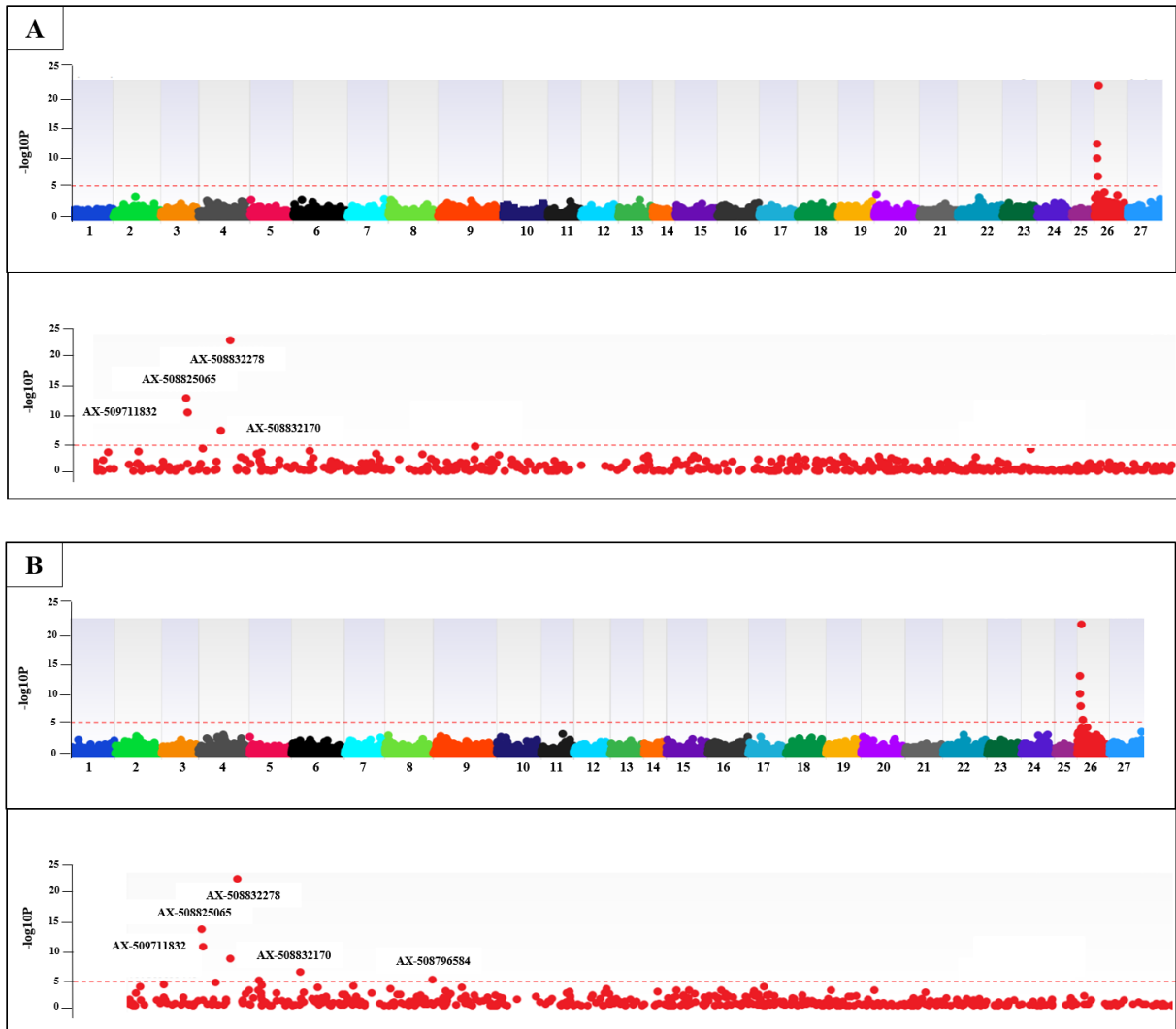


Figura 3.5: Gráfico de Manhattan para análise GWAS. A pontuação de $-\log_{10}P$ para associação de SNPs genotipados é plotada em função da posição do mapa genético. Cada grupo de ligação foi representado com SNPs de cores diferentes. (A) Primeiro conjunto de dados analisado com 151 amostras e 21.447 SNPs. (B) Segundo conjunto de dados analisados com 187 amostras e 21.447 SNPs. A figura abaixo do gráfico de Manhattan está demonstrado os SNPs do grupo de ligação 26. A linha pontilhada vermelha indica o limite significativo.

Tabela 3.3: Marcadores significativamente associados ao sexo fenotípico com base na pontuação LOD e utilizando dois conjuntos de dados com 151 e 187 amostras e 21.447 oriundos do AxiomSerraSNP.

SNPs	Grupo de ligação	Posição	Macho	Fêmea	151 amostras e 21.447 SNPs		187 amostras e 21.447 SNPs	
					$-\log_{10}(P)$	Acurácia	$-\log_{10}(P)$	Acurácia

AX-508832278	26	3.344.373	G/T	T/T	22,30	88%	21,91	87%
AX-508825065	26	2.269.020	C/G	C/C	12,47	68%	13,23	62%
AX-508784292	-	-	A/T	A/A	12,23	67%	9,63	66%
AX-509111832	26	2.314.316	A/G	G/G	9,93	65%	10,14	68%
AX-508832170	26	3.120.423	A/G	A/A	6,89	68%	8,13	63%

O SNP AX-508784292, não mapeado, apresentou acurácia de 67% e 66% no conjunto de 151 e 187 amostras, respectivamente, para associação com a determinação genética do sexo. A sequência das regiões flanqueantes deste SNP foram alinhadas em montagens do genoma do tabaqui presentes no NCBI com o intuito de identificar o grupo de ligação do marcador. Houve o alinhamento com *query* e identidade de 100% somente em um *scaffold* (ncbi: NW_023495214.1) que continha 12.546 pb. Além disso, foram feitas tentativas de alinhar a sequência das regiões flanqueantes de AX-508784292 com os genomas de *P. mesopotamicus* (ncbi: GCA_023558415.1) e da espécie modelo *Danio rerio* (ncbi: GCF_000002035.6). No entanto, não ocorreu nenhum alinhamento no genoma dessas espécies.

3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo identificou marcadores moleculares associadas ao sexo no *C. macropomum* utilizando o painel de média densidade AxiomSerraSNP. Foi necessária a realização de análises complementares para obtenção da posição dos marcadores genéticos do painel (subtítulo 3.2.4), uma vez que essa informação não foi disponibilizada juntamente com os genótipos e nem foi publicada no artigo científico em que o mapa genético de alta densidade da espécie foi construído (Nunes et al., 2017). Foram feitas também análises de associação genômica ampla (GWAS). No GWAS é necessário utilizar métodos que controlem o parentesco oculto (presença de relações genéticas desconhecidas entre os indivíduos) com o intuito de eliminar resultados falso positivos. Os efeitos da estrutura amostral presentes em análises de associação genética foram bem documentados e identificados como causa de algumas associações espúrias (Sul et al., 2018). Sendo assim, os indivíduos aparentados foram identificados e excluídos antes da realização do GWAS. Os resultados indicaram que a descoberta de segmentos compartilhados herdados de um ancestral comum (IBD, *Identity by descent*) entre pares de amostras e a deleção de indivíduos intimamente relacionados reduziu os efeitos do parentesco. Além disso, foi utilizado um modelo linear misto (EMMA) que considera o IBD para modelar a correlação entre fenótipos e genótipos (Kang et al., 2010).

Até o momento foi publicado somente um estudo, no qual foi feito um mapa de ligação utilizando um número limitado de famílias, que encontrou SNPs em regiões genômicas associadas a determinação do sexo em tambaqui (Varela et al. 2021). As regiões dos quatro SNPs nesse estudo foram englobadas pelo painel utilizado no presente trabalho, (Figura 1 do apêndice A) e somente o AX-508832278 apresentou LOD significativo. Os cinco marcadores genéticos associados ao sexo, corroboraram com Varela et al. (2021), uma vez que quatro SNPs foram localizados em um único cromossomo (GL 26) e todos os marcadores apresentaram

genótipos homozigotos para fêmeas e heterozigotos para machos, indicando a presença de um sistema genético XX/XY.

Esses cinco SNPs apresentaram acurácia variando de 62 a 88% na previsão correta do sexo. Inconsistências na atribuição sexual também foram relatadas em *Hippoglossus hippoglossus* (Weise et al., 2023), *Oreochromis mossambicus* (Tao et al., 2022) e *Cyclopterus lumpus* (Gutierrez et al., 2023). Essas inconsistências podem ser parcialmente explicadas pelo desequilíbrio de ligação incompleto dos marcadores moleculares com o gene mestre determinante do sexo (MSD) (Miranda & Somoza, 2022) e ou erros na sexagem inicial dos animais incluídos no estudo.

A identificação do sistema genético do tambaqui é importante para os estudos de espécies neotropicais. Os peixes de água doce dessa região representam mais de 17% das espécies descritas (5.600), no entanto, a variedade de estratégias de determinação sexual ainda é pouco compreendida nesse grupo (Fernandino & Hattori, 2019). A maioria das pesquisas que abordaram esse assunto tiveram como foco a ordem Atheriniformes que abrange a espécie *Odontesthes bonariensis* (Carriquiriborde et al., 2023; del Fresno et al., 2023; García-Cruz et al., 2020; Strüssmann et al., 2021; Torres-Martínez et al., 2024). O *C. macropomum* pertence a ordem Characiformes. Dentro desta ordem foram descobertos sistemas genéticos ZZ/ZW, como nos gêneros *Leporinus*, *Parodon*, *Apareiodon*, *Saccodon*, *Triportheus* e *Characidium*, enquanto o gênero *Erythrinus* foi caracterizado pela heterogametia masculina XX/XY (Fernandino & Hattori, 2019).

Compreender os mecanismos de determinação do sexo do tambaqui também é relevante devido a presença de dimorfismo sexual para crescimento. Estudos demonstraram que as fêmeas crescem mais rápido do que os machos (Almeida et al., 2016). Esse padrão de crescimento é observado em outras espécies neotropicais, como *O. bonariensis* (Miranda & Somoza, 2022), *Astyanax scabripinnis* (Castro et al., 2014), *Piaractus mesopotamicus* (Barbosa et al., 2022) e *Leporinus elongatus* (Fernandino & Hattori, 2019). O dimorfismo sexual de crescimento torna favorável o estabelecimento de populações exclusivamente de fêmeas para a engorda em cativeiro. Essas populações monossexuais podem ser produzidas pelo acasalamento de machos com sexo invertido por hormônio (neomachos – XX) com fêmeas normais (XX). No entanto para utilizar essa estratégia, é necessário o desenvolvimento de ferramentas moleculares, como marcadores sexuais, que permitam identificar os neomachos de forma precisa.

Várias abordagens moleculares foram utilizadas para identificar marcadores sexuais em peixes nos últimos anos, como DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*), Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*), microssatélites com repetições de sequência simples (SSR, *Simple Sequence Repeats*) e tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (NGS, *Next Generation Sequencing*) (Gong et al., 2022). No presente estudo, inicialmente, foram utilizados dados genotípicos que já estavam disponíveis e em seguida as amostras com parentesco reduzido foram genotipadas com o chip Axiom SerraSNP. O sequenciamento de genoma completo tem sido amplamente utilizado nos últimos anos para identificar regiões determinantes do sexo (Cáceres et al., 2019; Huang et al., 2024; Li et al., 2020; Wen et al., 2022; Yasuike et al., 2016; Zeng et al., 2024), no entanto, alguns fatores impossibilitaram que essa tecnologia fosse utilizada neste trabalho, como, a necessidade de DNA com melhor integridade, de alta qualidade, o maior custo em comparação ao chip utilizado e maior tempo para obtenção dos resultados (Yin et al., 2018). Apesar disso, informações relevantes foram obtidas, uma vez que as análises de associação demonstraram marcadores que estão em forte desequilíbrio de ligação com o gene mestre determinante do sexo e indicaram um sistema de determinação sexual XX/XY. Esses resultados indicam uma direção para pesquisas complementares que ajudem a compreender melhor os mecanismos de determinação do sexo em tambaqui. Desse modo, no capítulo seguinte, foi feita uma investigação dos genes próximos as regiões genômicas em que os SNPs associados ao sexo foram encontrados.

REFERÊNCIAS

- Almeida, F. L., Lopes, J. S., Crescencio, R., Izel, A. C. U., Chagas, E. C., & Boijink, C. (2016). Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, *452*, 224–232.
- Barbosa, R. P., Kuradomi, R. Y., Sato, R. T., & Batlouni, S. R. (2022). *Piaractus mesopotamicus* gonad differentiation. *Aquaculture Research*, *53*(11), 4106–4115.
- Boyce, T. M., Zwick, M. E., & Aquadro, C. F. (1989). Mitochondrial DNA in the bark weevils: Size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, *123*(4), 825–836.
- Bushnell, B. (2014, September 19). *BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner*.
- Cáceres, G., López, M. E., Cádiz, M. I., Yoshida, G. M., Jedlicki, A., Palma-Véjares, R., Travisany, D., Díaz-Domínguez, D., Maass, A., Lhorente, J. P., Soto, J., Salas, D., & Yáñez, J. M. (2019). Fine Mapping Using Whole-Genome Sequencing Confirms Anti-Müllerian Hormone as a Major Gene for Sex Determination in Farmed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *9*, 3213–3223.
- Carrquiriborde, P., Fernandino, J. I., López, C. G., Benito, E. de S., Gutierrez-Villagomez, J. M., Cristos, D., Trudeau, V. L., & Somoza, G. M. (2023). Atrazine alters early sexual development of the South American silverside, *Odontesthes bonariensis*. *Aquatic Toxicology*, *254*.
- Castro, J. P., Moura, M. O., Moreira-Filho, O., Shibatta, O. A., Santos, M. H., Nogaroto, V., Vicari, M. R., de Almeida, M. C., & Artoni, R. F. (2014). Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, *12*(2), 429–438.
- del Fresno, P. S., Garcia de Souza, J. R., Colautti, D. C., Yamamoto, Y., Yokota, M., Strüssmann, C. A., & Miranda, L. A. (2023). Sex reversal of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), a species with temperature-dependent sex determination, in a seminatural environment. *Journal of Fish Biology*, *102*(1), 75–82.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, *208*(3–4), 191–364.

Eisbrenner, W. (2013). *Sex Determination in Tasmanian Atlantic Salmon*.

<http://summit.sfu.ca/item/13615>

Fernandino, J. I., & Hattori, R. S. (2019). Sex determination in Neotropical fish: Implications ranging from aquaculture technology to ecological assessment. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 273, pp. 172–183). Academic Press Inc.

García-Cruz, E. L., Yamamoto, Y., Hattori, R. S., de Vasconcelos, L. M., Yokota, M., & Strüssmann, C. A. (2020). Crowding stress during the period of sex determination causes masculinization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a fish with temperature-dependent sex determination. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 245.

Gutierrez, A. P., Selly, S. L. C., Pountney, S. M., Taggart, J. B., Kokkinias, P., Cavois-Rogacki, T., Fernandez, E. J., Migaud, H., Lein, I., Davie, A., & Bekaert, M. (2023). Development of genomic markers associated to growth-related traits and sex determination in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Genomics*, 115(6).

Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F., Martínez, P., & Porto-Foresti, F. (2014). Genetic identification of F1 and post-F1 serrasalmid juvenile hybrids in Brazilian aquaculture. *PLoS ONE*, 9(3).

Huang, W., Lai, J., Liang, W., Ye, S., Li, J., Zhou, J., Zhang, Y., Peng, S., Zhan, H., Zheng, P., Chen, D., Wang, K., Han, C., & Li, Q. (2024). Identification of sex-specific DNA markers in the army fish (*Spinibarbus hollandi*) by whole genome re-sequencing method. *Aquaculture*, 583.

IBGE. (2024). *Produção da Pecuária Municipal 2023*. *Imprensa Oficial*.

Kang, H. M., Sul, J. H., Service, S. K., Zaitlen, N. A., Kong, S. Y., Freimer, N. B., Sabatti, C., & Eskin, E. (2010). Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 42(4), 348–354.

Kent, J. (2002). BLAT - The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Research*, 12, 656–664.

Li, Y. L., Xing, T. F., & Liu, J. X. (2020). Genome-wide association analyses based on whole-genome sequencing of *Protosalanx hyalocranium* provide insights into sex determination of Salangid fishes. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 1038–1049.

Lu, J., Li, R., Bekaert, M., Migaud, H., Liu, X., Chen, Q., Zhang, W., Mu, C., Song, W., & Wang, C. (2021). Development and validation of SNP genotyping assays to identify genetic sex in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture Reports*, 20.

Miranda, L. A., & Somoza, G. M. (2022). Effects of Anthropogenic Pollutants Identified in Pampas Lakes on the Development and Reproduction of Pejerrey Fish *Odontesthes bonariensis*. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A.

Nunes, J. de R. da S., Liu, S., Pértille, F., Perazza, C. A., Villela, P. M. S., De Almeida-Val, V. M. F., Hilsdorf, A. W. S., Liu, Z., & Coutinho, L. L. (2017). Large-scale SNP discovery and construction of a high-density genetic map of *Colossoma macropomum* through genotyping-by-sequencing. *Scientific Reports*, 7.

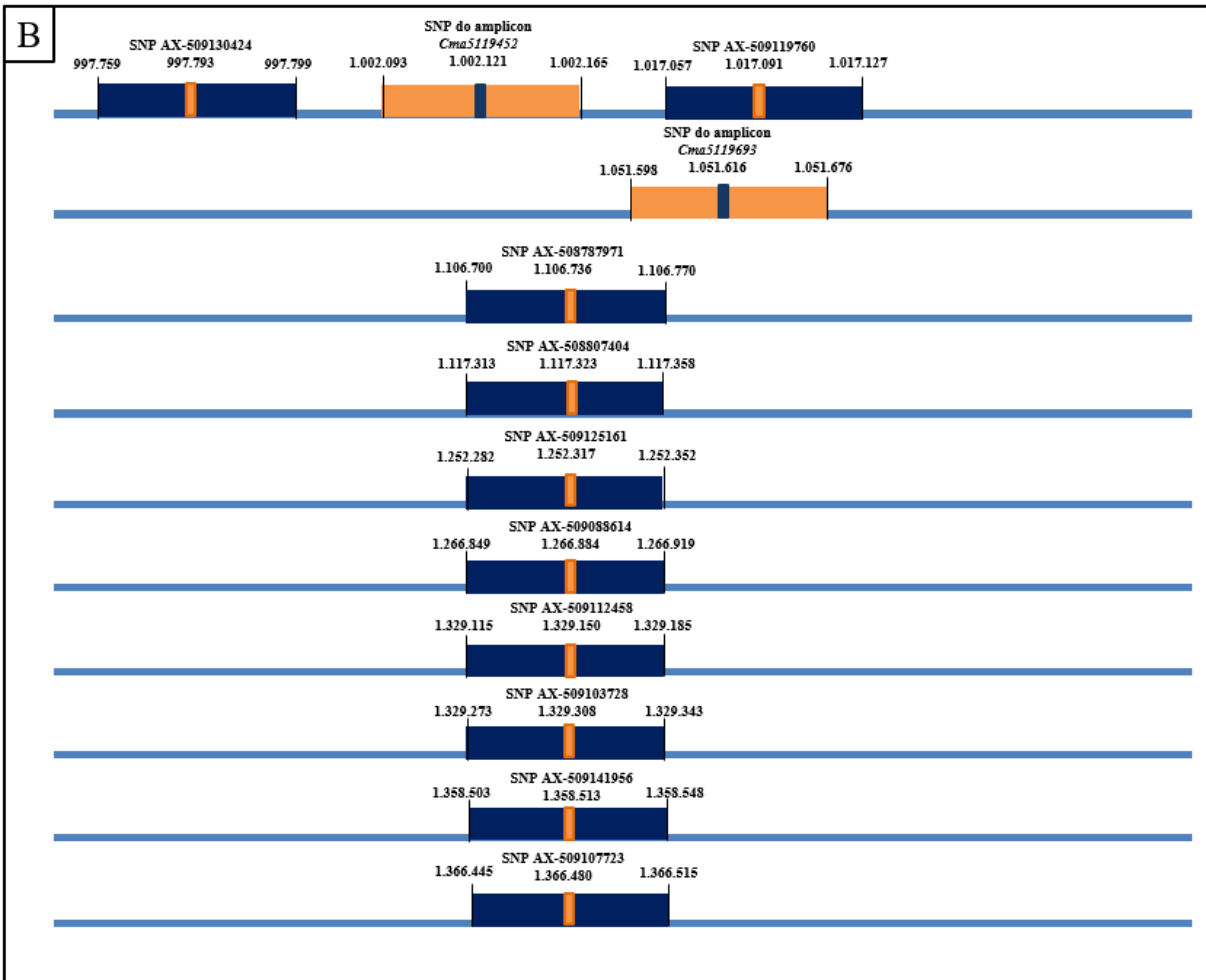
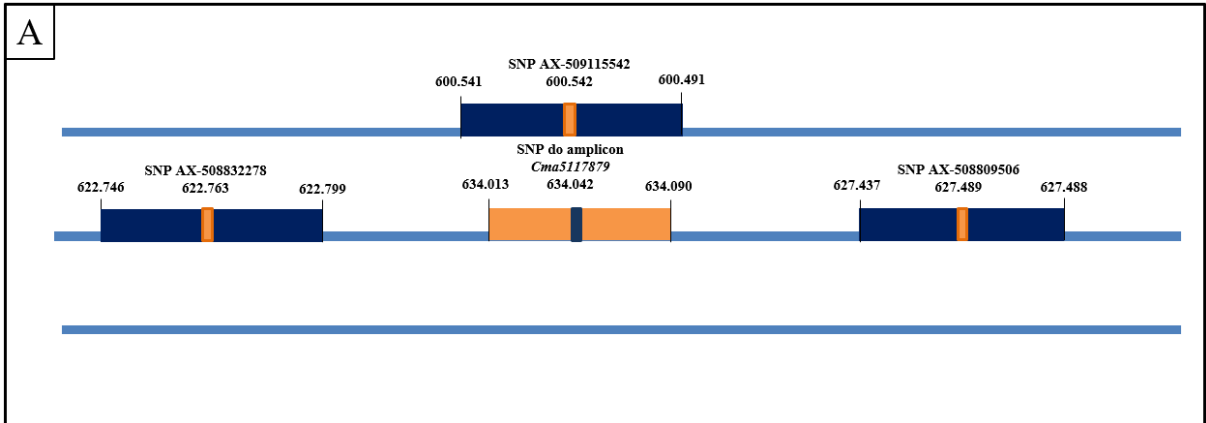
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. In *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture* (Vol. 197). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-50913-0.50014-x>
- Pincinato, R. B. M., & Asche, F. (2016). The development of Brazilian aquaculture: Introduced and native species. *Aquaculture Economics and Management*, 20(3), 312–323.
- Reis, V. R., & Almeida, F. L. (2019). Effect of 17 β -oestradiol on the sex ratio of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Aquaculture Research*, 50(1), 154–161.
- Saint-Paul, U. (2017). Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, 5(1).
- Strüssmann, C. A., Yamamoto, Y., Hattori, R. S., Fernandino, J. I., & Somoza, G. M. (2021). Where the Ends Meet: An Overview of Sex Determination in Atheriniform Fishes. In *Sexual Development* (Vol. 15, Issue 1, pp. 80–92). S. Karger AG.
- Sul, J. H., Martin, L. S., & Eskin, E. (2018). Population structure in genetic studies: Confounding factors and mixed models. In *PLoS Genetics* (Vol. 14, Issue 12). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007309>
- Tang, H., Zhang, X., Miao, C., Zhang, J., Ming, R., Schnable, J. C., Schnable, P. S., Lyons, E., & Lu, J. (2015). ALLMAPS: Robust scaffold ordering based on multiple maps. *Genome Biology*, 16(1).
- Tao, W., Zhu, X., Cao, J., Xiao, H., Dong, J., Kocher, T. D., Lu, M., & Wang, D. (2022). Screening and characterization of sex-linked DNA markers in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture*, 557.
- Torres-Martínez, A., Hattori, R. S., Fernandino, J. I., Somoza, G. M., Hung, S. D., Masuda, Y., Yamamoto, Y., & Strüssmann, C. A. (2024). Temperature- and genotype-dependent stress response and activation of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis during temperature-induced sex reversal in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a species with genotypic and environmental sex determination. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 582.
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., & Pilarski, F. (2016). South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.
- Varela, E. S., Bekaert, M., Ganeco-Kirschnik, L. N., Torati, L. S., Shiotsuki, L., de Almeida, F. L., Villela, L. C. V., Rezende, F. P., da Silva Barroso, A., de Freitas, L. E. L., Taggart, J. B., & Migaud, H. (2021). A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*. *BMC Genomics*, 22(709).
- Weise, E. M., Van Wyngaarden, M., Den Heyer, C., Mills Flemming, J., Kess, T., Einfeldt, A. L., Fisher, J. A. D., Ditta, R., Pare, G., & Ruzzante, D. E. (2023). SNP Panel and Genomic Sex Identification in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Marine Biotechnology*, 25(4), 580–587.
- Wen, M., Zhang, Y., Wang, S., Hu, F., Tang, C., Li, Q., Qin, Q. B., Tao, M., Zhang, C., Zhao, R., Wang, S., Liu, Q., Tang, C., & Liu, S. (2022). Sex locus and sex markers identification using whole genome pool-sequencing approach in the largemouth bass (*Micropterus Salmoides* L.). *Aquaculture*, 559.

Yasuike, M., Fujiwara, A., Nakamura, Y., Iwasaki, Y., Nishiki, I., Sugaya, T., Shimizu, A., Sano, M., Kobayashi, T., & Ototake, M. (2016). A functional genomics tool for the Pacific bluefin tuna: Development of a 44K oligonucleotide microarray from whole-genome sequencing data for global transcriptome analysis. *Gene*, *576*(2), 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.023>

Yin, R., Kwoh, C. K., & Zheng, J. (2018). Whole genome sequencing analysis. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* (Vols. 1–3, pp. 176–183). Elsevier.

Zeng, D., Chen, M., Zeng, J., Tu, Y., Zhang, Y., Tan, M., & Wang, X. (2024). Whole-genome resequencing reveals novel sex-related markers and candidate gene in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Journal of the World Aquaculture Society*.

APÊNDICE A – Posições das sondas dos SNPs do painel Axiom SerraSNP e dos *amplicons* com SNPs relacionados a determinação do sexo em tabaqui descobertos por Varela et al (2021).



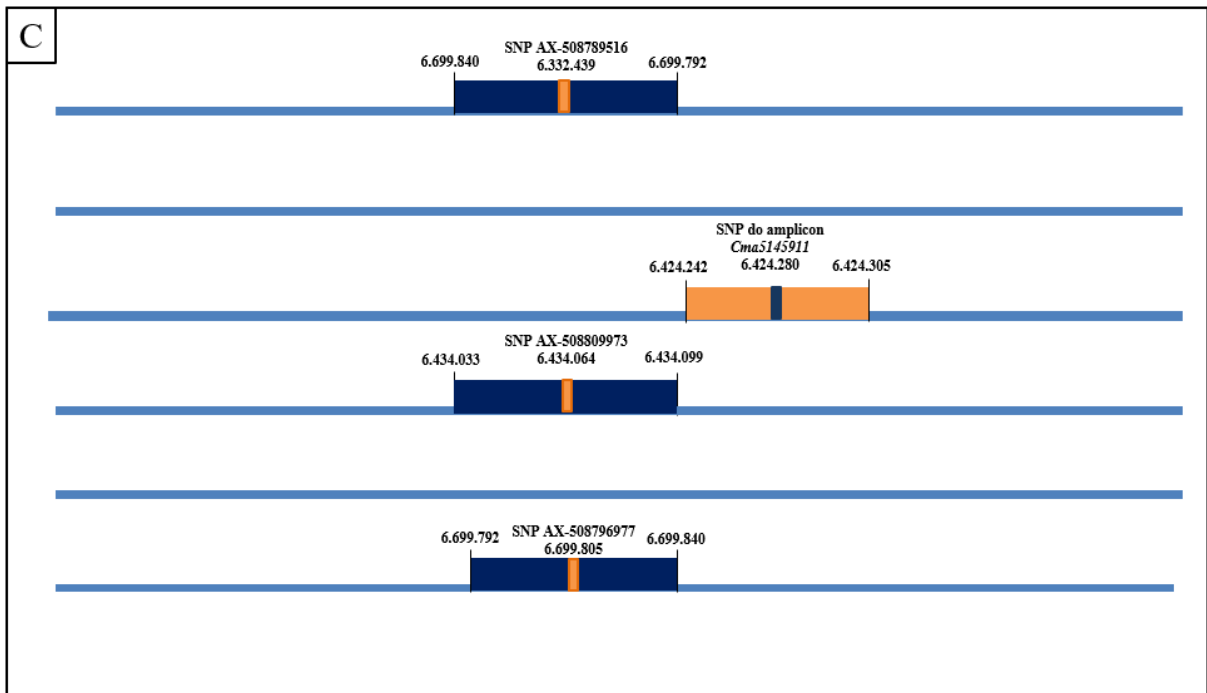


Figura 1: Posições das sondas dos SNPs do painel Axiom SerraSNP (azul escuro) e dos quatro amplicons (A, B e C) com SNPs relacionados a determinação do sexo em tabaqui descobertos por Varela et al (2021) (laranja).

CAPÍTULO 4

PROSPECÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES CANDIDATOS A DETERMINAÇÃO DO SEXO NO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

RESUMO

PROSPECÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES CANDIDATOS A DETERMINAÇÃO DO SEXO NO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Nayelle Meyre Lisboa Silva¹, Patrícia Ianella², Michel Eduardo Beleza Yamagishi, Alexandre Rodrigues Caetano³

1 Bióloga/ Doutoranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

2 Bióloga/ Doutora – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

3 Matemático/ Doutor – Embrapa Informática Agropecuária

3 Zootecnista/ Doutor – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

O tambaqui, *Colossoma macropomum* é uma espécie nativa de grande relevância econômica que representou 15% da piscicultura nacional em 2022. A fêmea do tambaqui é maior do que o macho e devido a isso a descoberta de genes relacionados à determinação sexual é relevante para a aquicultura. Cinco SNPs associados ao sexo foram encontrados em um estudo de GWAS (Capítulo III) quando foi utilizado um conjunto de 192 amostras de machos e fêmeas e o painel Axiom SerraSNP (29.575 SNPs). A região genômica em que esses marcadores moleculares estavam localizados foi investigada no presente estudo. Foram descobertos o grupo de ligação e a posição desses SNPs no genoma referência e possíveis genes mestres determinantes do sexo foram sequenciados para identificar polimorfismos genéticos ligados ao

sexo. SNPs foram localizados em íntrons dos genes *znrf2b*, *zgc:158766* e *LOC118799143* e em uma região próxima ao gene *bHLH*. Em razão disso, foram desenhados primers em íntrons e éxons dos genes *znrf2b* e em éxons dos genes *bHLH*, *fzd1* e *nod1*, sendo que esses dois últimos estavam próximos ao *znrf2b*. Foram feitas PCRs com os primers prospectados e com um subconjunto de amostras de doze machos e doze fêmeas (proveniente das 192 amostras do estudo prévio). As análises de GWAS demonstraram que cinco SNPs estavam associados ao sexo corroborando com o sistema de determinação genético XX/XY. Os marcadores mais associados estavam localizados nos íntrons do gene *znrf2b* e no éxon do *nod1*. O SNP encontrado no *nod1* é responsável por uma variação no códon do RNAm (TGC e TGT), no entanto as duas trincas de bases codificam um mesmo aminoácido, que é a cisteína. Os primers desenhados no éxon do gene *bHLH* amplificaram o fragmento de DNA principalmente nos machos. Os resultados indicam que algum dos genes (*znrf2b*, *bHLH*, *fzd1* ou *nod1*) podem ser o mestre da determinação do sexo em tabaqui. Não foi possível sequenciar todos os éxons desses genes devido à ausência de amplificação das sequências-alvo (dentre os 26 primers desenhados, somente 15 amplificaram o fragmento de DNA). Sendo assim, é necessário a realização de estudos complementares que explorem ainda mais essas regiões para compreender melhor os mecanismos de determinação e diferenciação do sexo em tabaqui.

PALAVRAS-CHAVES: Dedo de zinco; fator nod; frizzled; hélice-alça-hélice.

ABSTRACT

PROSPECTING POLYMORPHISMS IN CANDIDATE GENES FOR SEX DETERMINATION IN TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Tambaqui, *Colossoma macropomum*, is a native species of great economic relevance that represented 15% of national fish farming in 2022. Female tambaqui are larger than males and therefore the discovery of genes related to sex determination is relevant for aquaculture. Five SNPs associated with sex were found in Chapter III when a set of 192 samples and the Axiom SerraSNP panel (29,575 SNPs) were used. The genomic region in which these molecular markers were located was investigated in the present study. The linkage group and the position of these SNPs in the reference genome were discovered and possible master sex-determining genes were sequenced to identify sex-linked genetic polymorphisms. The SNPs were in introns of the *znrf2b*, *zgc:158766* and *LOC118799143* genes and in a region close to the *bHLH* gene. Therefore, primers were designed in introns and exons of the *znrf2b* genes and in exons of the *bHLH*, *fzd1* and *nod1* genes, the latter two being close to *znrf2b*. Then, PCRs were performed with the prospective primers and with a subset of samples from twelve males and twelve females (from the 192 samples of the previous study). The GWAS analyses showed that five SNPs were associated with sex, corroborating the XX/XY genetic determination system. The most associated markers were in the introns of the *znrf2b* gene and in the *nod1* exon. The SNP found in *nod1* is responsible for a variation in the mRNA codon (TGC and TGT); however, the two triplets of bases encode the same amino acid, which is cysteine. The primers designed in the *bHLH* gene exon amplified the DNA fragment mainly in males. The results indicate that

some of the genes (*znrf2b*, *bHLH*, *fzd1* or *nod1*) may be the master sex determination gene in tambaqui, since it was not possible to sequence all the exons of these genes due to the lack of amplification of the target sequences (among the 26 primers designed, only 15 amplified the DNA fragment). Therefore, it is necessary to carry out complementary studies that further explore these regions to better understand the mechanisms of sex determination and differentiation in tambaqui.

KEYWORDS: factor nod; frizzled; helix-loop-helix; zinc and ring finger.

4.1 INTRODUÇÃO

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é uma espécie nativa de grande relevância econômica que representou 15% da piscicultura nacional em 2022, sendo superado somente pela tilápia (*Oreochromis niloticus*), uma espécie exótica oriunda do delta do rio Nilo cuja produção representa 55% da produção aquícola do Brasil (IBGE, 2024). Esta espécie apresenta várias características zootécnicas e fisiológicas atrativas para a produção em cativeiro, como: o hábito alimentar onívoro e a fácil aceitação de rações aquáticas; o rápido crescimento em cativeiro; a boa adaptação a altas densidades populacionais em condições de engorda; a tolerância a baixas concentrações de oxigênio dissolvido; a facilidade de produção de alevinos; a resistência a doenças; e a grande aceitação do mercado consumidor (Hilsdorf et al., 2022).

Outra característica importante dessa espécie é a presença de dimorfismo sexual de crescimento em que as fêmeas crescem mais rápido do que os machos (Almeida et al., 2016). Essa característica fenotípica é valiosa para a piscicultura e torna atraente o uso de métodos para estabelecimento de populações monosexo de fêmeas para animais destinados a engorda e abate. Essas populações podem ser geradas com cruzamentos dirigidos de peixes que passaram por reversão sexual com hormônios (Weise et al., 2023). No entanto, para que se possa aplicar essa estratégia, é necessário desenvolver testes moleculares simples, de alta acurácia, para identificar o sexo genotípico dos machos submetidos a tratamentos hormonais. Vários estudos realizados em outras espécies de peixes alcançaram esse objetivo quando encontraram o gene mestre determinante do sexo (MSD, *Master Sex Determination*) (Mustapha et al., 2018).

Os mecanismos de determinação genética de sexo em peixes teleósteos são geralmente definidos por um gene crítico localizado em um cromossomo sexual ou por múltiplos genes situados tanto em autossomos como em cromossomos sexuais (Devlin & Nagahama, 2022). Dentre os principais sistemas de determinação do sexo, encontram-se o

sistema heterogamético masculino XX/XY e o sistema heterogamético feminino ZZ/ZW, além das suas variantes. Sember et al. (2021) identificaram 440 registros de cromossomos sexuais de peixes e notaram que o sistema XX/XY prevalece nesse grupo. Já Kitano et al. (2023) fizeram um levantamento bibliográfico em que constataram que genes mestres determinantes do sexo foram descobertos em 114 espécies de teleósteos.

O primeiro gene MSD identificado em peixes, especificamente em medaka (*Oryzias latipes*), foi o *Dmy/dmrt1bY*. Esse gene desencadeia a via masculina e reprime a via feminina. Posteriormente, foram encontrados outros genes em teleósteos. O gene *gsdfY* foi encontrado em *Oryzias luzonensis* no cromossomo Y e o *gsdf* em *Oncorhynchus mykiss* em um cromossomo autossômico (Myosho et al., 2012; Sawatari et al., 2007), *Amhr2*, gene receptor do hormônio Anti-Muleriano, foi identificado em *Takifugu rubripes* (Kamiya et al., 2012), enquanto *Amhy*, hormônio Anti-Muleriano ligado ao Y, foi encontrado em *Odontesthes* (Hattori et al., 2012). O *sdY* é determinante do sexo na maioria das espécies de salmonídeos, como *Salmo salar*, *Salmo trutta* e *Salvelinus alpinus* (Quéméré et al., 2014; Yano et al., 2013). *Dmrt1* foi identificado como candidato para determinação do sexo em *Scatophagus argus* e *Cynoglossus semilaevis* (Cui et al., 2017; Mustapha et al., 2018). Ainda mais recentemente, Cáceres et al. (2019) fizeram um estudo de associação genômica ampla (GWAS, *Genome Wide Association Studies*) com Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNPs) em tilápia (*Oreochromis niloticus*) para identificar 36 SNPs no cromossomo 23 altamente relacionados ao sexo e 10 desses marcadores interceptaram o gene determinante do sexo *Amh*.

Um mapa de ligação genético, gerado com 14.805 SNPs, foi utilizado para identificar marcadores ligados ao sexo no tambaqui (Varela et al., 2021). O estudo identificou o mapeamento da região associada ao sexo em um único cromossomo e marcadores sexuais com genótipos heterogamético para machos e homogamético para fêmeas que sugeriram um sistema genético de determinação do sexo do tipo XX/XY. No entanto, não foi feita uma busca do possível gene MSD nos cromossomos sexuais, ou seja, ainda não está claro quais variantes causadoras putativas específicas, em que gene(s), estão envolvidas na regulação do sexo no tambaqui. Outro estudo realizado com a mesma espécie fez análises de GWAS utilizando o painel de média densidade Axiom SerraSNP e identificou cinco marcadores moleculares associados ao sexo (Capítulo III). O presente trabalho teve como objetivo identificar genes candidatos à MSR em tambaqui que se encontrem localizados próximos aos SNPs identificados como sendo associados à determinação do sexo e, prospectar SNPs nestes genes candidatos em tambaqui.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Identificação de potenciais genes candidatos

Um conjunto de 192 amostras de reprodutores de tabaquis (96 fêmeas e 96 machos) de sete produtores brasileiros, amostrados entre 2019 e 2022, tiveram seu DNA genotipado com o painel Axiom SerraSNP (29.575 SNPs) em um estudo prévio (Capítulo III). A análise de associação do genoma completo (GWAS) identificou cinco SNPs (AX-508832278, AX-508825065, AX-509111832, AX-508784292 e AX-508832170) significativamente relacionados a determinação do sexo com acurácia variando entre 62 e 88%.

No presente trabalho essas informações foram utilizadas, inicialmente, para verificar o grupo de ligação e a posição em que esses marcadores estão localizados no genoma referência do tabaqui disponível no banco de dados do NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*). Para tanto, foi feita uma busca da sequência flanqueante de cada uma das cinco SNPs no BLAST. Em seguida, foi realizado um mapeamento destas sequências para encontrar genes localizados próximos aos marcadores com o intuito de identificar potenciais genes mestres determinantes do sexo na espécie (Figura 4.1).

Além disso, foram feitas análises de genômica comparativa com alinhamentos dos potenciais genes candidatos com os genomas disponíveis do *Homo sapiens* (ncbi: GCF_000001405.40), do *Danio rerio* (peixe-zebra) (ncbi: GCF_000002035.6) e do *Piaractus mesopotamicus* (pacu) (ncbi: GCA_023558415.1), sendo esta última, a espécie geneticamente mais próxima do tabaqui (Mateussi et al., 2020). As sequências dos genomas encontrados no NCBI foram alinhadas no programa Needle (EMBOSS) para melhor visualização dos *gaps*.

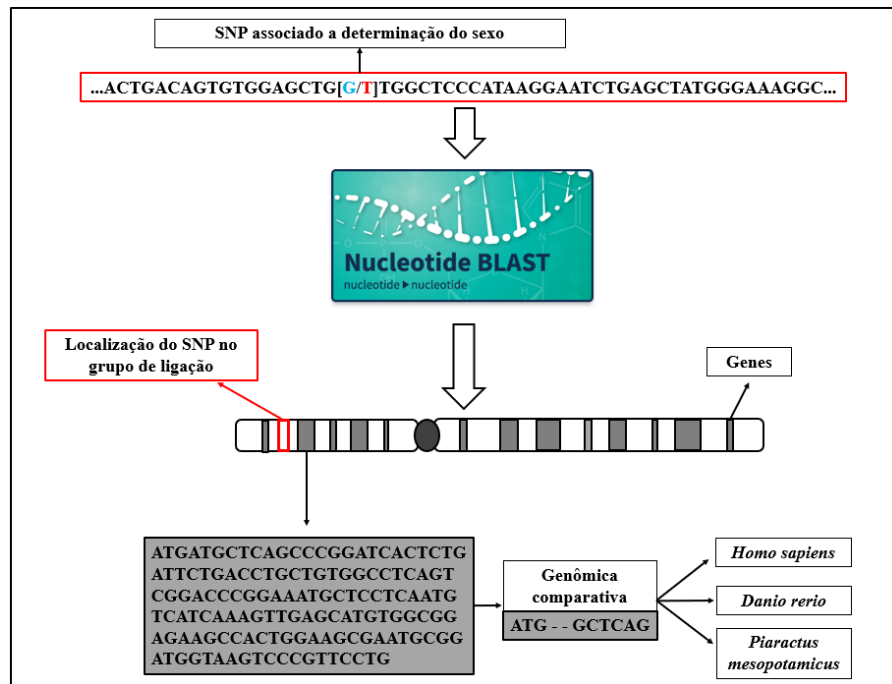


Figura 4.1: Representação da metodologia para identificação do potencial gene mestre determinantes do sexo em tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Três *amplicons* presentes apenas em machos do pacu (*P. mesopotamicus*) (Mascali et al., 2022) foram alinhados ao genoma do *C. macropomum* para identificar as regiões homólogas no tambaqui, em bases de dados públicas (NCBI: GCF_904425465.1) e privadas (montagem do genoma feito pela Embrapa (dados não publicados)). As regiões genômicas do *C. macropomum* alinhadas com os *amplicons* sexo específicos do pacu foram buscadas em dados privados ainda não publicados, uma vez que esses bancos de dados possuem sequências de indivíduos machos e de fêmeas. Essa busca foi realizada utilizando o software IGV (*Integrative Genomics Viewer*) (Robinson et al., 2011).

4.2.2 Desenho dos iniciadores para sequenciamento dos genes associados a determinação do sexo

Os primers foram projetados utilizando o programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2012) posicionados em íntrons e éxons de genes potencialmente associados ao sexo. Adicionalmente, éxons de outros genes localizados próximos à região genômica identificada também foram alvo de *primers*. Além disso, SNPs associados ao sexo identificados recentemente por Varela et. al 2021, foram mapeados no genoma e *primers* específicos foram desenhados para comparar a acurácia obtida no presente trabalho e no estudo feito anteriormente. Como complemento, regiões genômicas do tambaqui que apresentaram

alinhamento com regiões sexo específicas do pacu (*P. Mesopotamicus*) (Mascali et al., 2022), também foram selecionadas como alvos para amplificação.

As reações de PCR foram realizadas utilizando os *primers* desenhados e um subconjunto de 24 amostras, composto por 12 machos e 12 fêmeas (Tabela 4.1), as quais também foram previamente genotipadas com o painel AxiomSerraSNP. As condições da PCR incluíram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 seg, anelamento com temperaturas que variaram entre os primers (Tabela 4.2) por 30 seg, extensão a 72°C por 60 s; e alongamento final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,0% com brometo de etídio para visualização das bandas, seguida de purificação com o kit ExoSAP-IT™ da Thermo Fisher. Posteriormente, os produtos de PCR foram sequenciados com um protocolo Sanger em um ABI 3100 e por fim as sequências foram alinhadas e analisadas para a identificação de variações de um único nucleotídeo (SNPs) potencialmente específicos para o sexo. Esta última etapa foi feita utilizando o programa PhedPhap Consed (Gordon, 2003).

Tabela 4.1: Amostras de produtores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizados no estudo.

Produtor	Nº de amostras	
	Fêmeas	Machos
1	2	2
2	3	3
3	1	1
4	2	2
5	1	1
6	1	1
7	2	2
Total	12	12

4.2.3 Estudo de associação genômica ampla - GWAS

Após a identificação de SNPs nos genes candidatos à determinantes do sexo, o software SNP e Suite Variation v8.x (Golden Helix) foi utilizado para análises de associação do genoma. O fenótipo binário para determinação do sexo foi registrado como “0” para fêmeas e “1” para machos. As análises foram conduzidas utilizando o modelo linear misto de locus

único (EMMA – *Efficient Mixed Model Association*) e modelo genético dominante. Uma matriz de parentesco foi calculada usando todos os marcadores para corrigir potenciais vieses decorrentes da estrutura da subpopulação e ao parentesco entre os indivíduos. O modelo usado tem o seguinte formato:

$$Y = X\beta + Z\mu + \epsilon$$

onde:

Y é o vetor dos fenótipos (sexo)

X é uma matriz de efeitos fixos composta pelos genótipos de todos os marcadores

β é o vetor de incidência dos efeitos fixos (marcadores)

Z é a matriz dos coeficientes de identidade estimados entre todos os indivíduos

μ é o vetor dos coeficientes dos efeitos aleatórios

ϵ é o efeito dos resíduos

Após a realização do GWAS, os genótipos dos marcadores associados a determinação do sexo foram averiguados em relação a acurácia, ou seja, foi quantificado o nível de erro entre o genótipo desejado e o genótipo observado.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Identificação de potenciais genes candidatos

Os SNPs previamente relacionados à determinação do sexo foram identificados em íntrons dos genes *znrf2b*, *zgc:158766* e *LOC118799143*. Mais especificamente, a sonda utilizada na genotipagem da SNP AX-508832278 foi mapeada no *scaffold* NW_023494809.1 (NCBI) e no íntron do gene *znrf2b* (GL26: 622.746 – 622.799). De forma semelhante, o *amplicon* 5117879 descrito por Varela et al. (2021) também foi encontrado na mesma região genômica (GL26: 634.013 – 634.041) (Figura 4.2A). Este último *amplicon* contém outro SNP associado ao sexo genotípico em tabaqui.

Outra busca realizada com o gene *znrfb2* resultou no alinhamento da sequência da proteína do gene do *C. macropomum* com a proteína *znrf2b* do *Homo sapiens*. Esse alinhamento apresentou *gap* de 33% e identidade de 53%. Os *gaps* foram encontrados nas proteínas do tabaqui em relação à humana (Figura 4.2B). Além disso, quando a sequência dos éxons do gene *znrf2b* do tabaqui foi alinhada ao genoma do peixe-zebra foi encontrado um *query* de 35% e identidade de 93,58% (Figura 4.3).

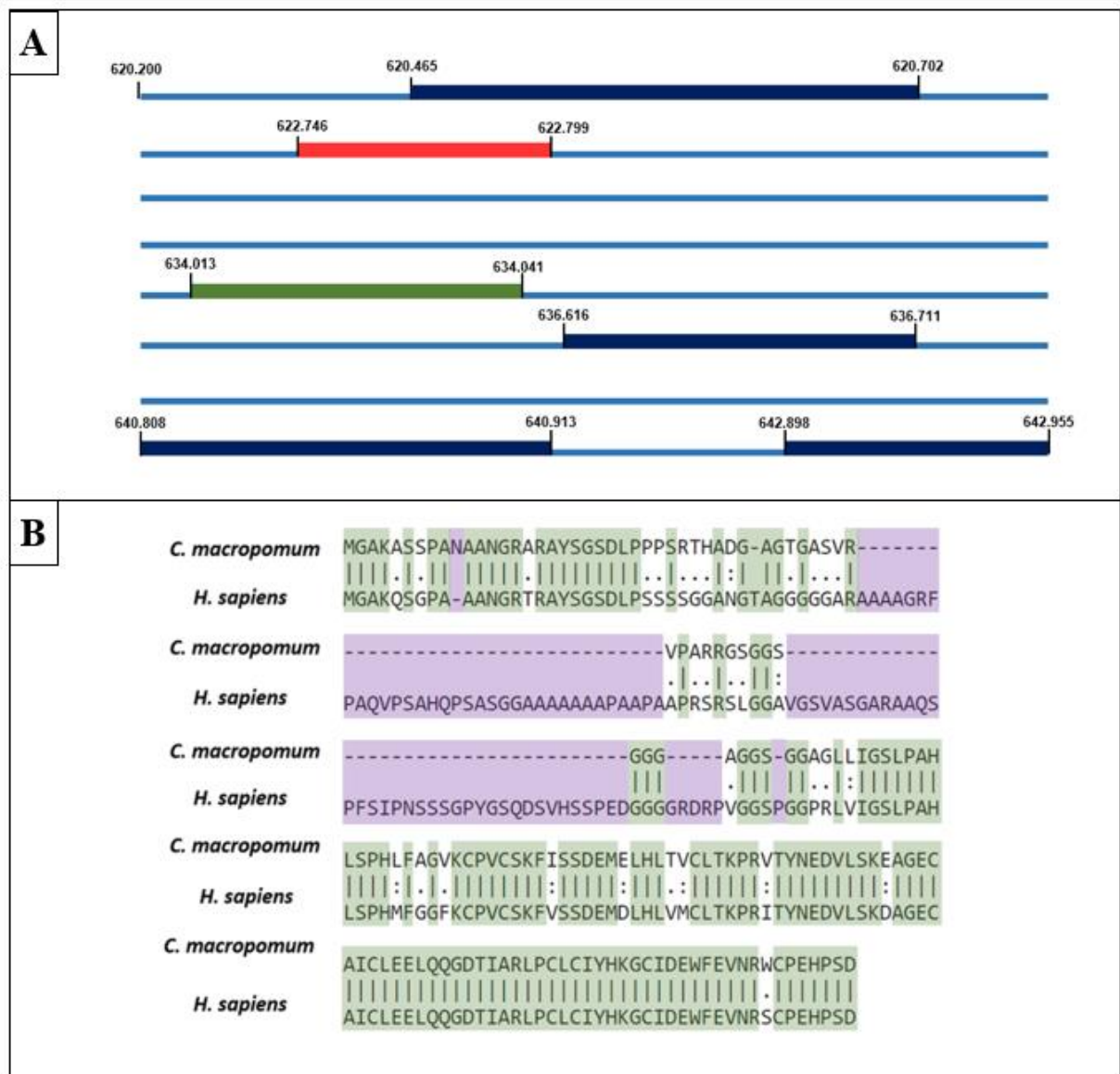


Figura 4.2: (A) Representação do gene *znrf2b* do *Collossoma macropomum* localizado no *scaffold* NW_023494809.1 do NCBI. Os números indicam a localização das sequências de DNA. As sequências representam: azul claro – íntrons; azul escuro –éxons; vermelho – sonda do SNP AX-508832278 associado ao sexo; verde – *amplicon* 5117879 em que está localizado um dos SNPs associados ao sexo genotípico em tabaqui descrito por Varela et al. (2021). (B) Alinhamento da sequência da proteína do gene *znrf2b* do tabaqui com a do humano. As sequências em roxo representam os *gaps* e o verde indica a presença de identidade.

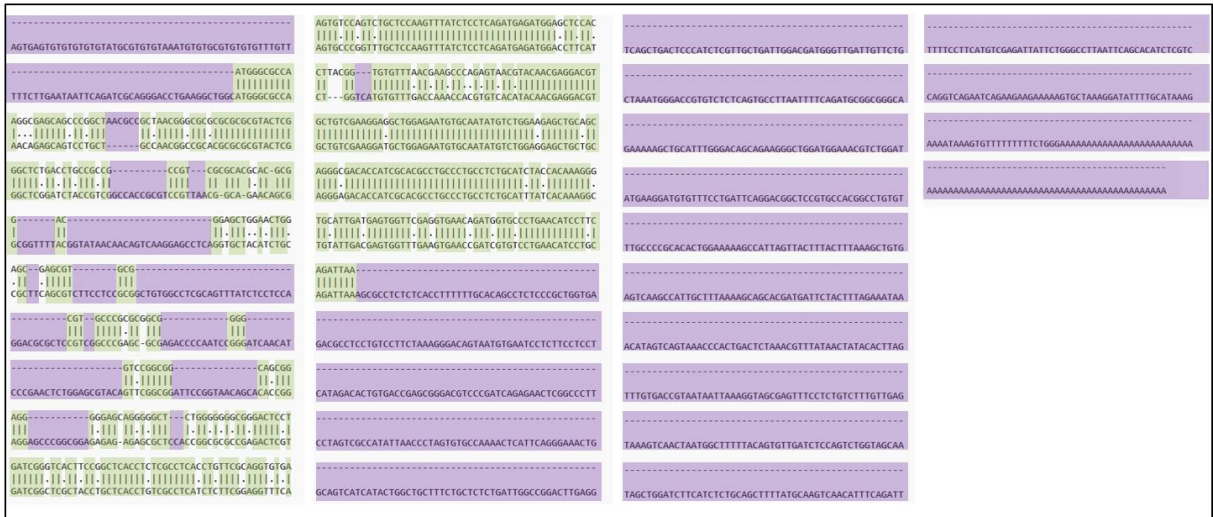
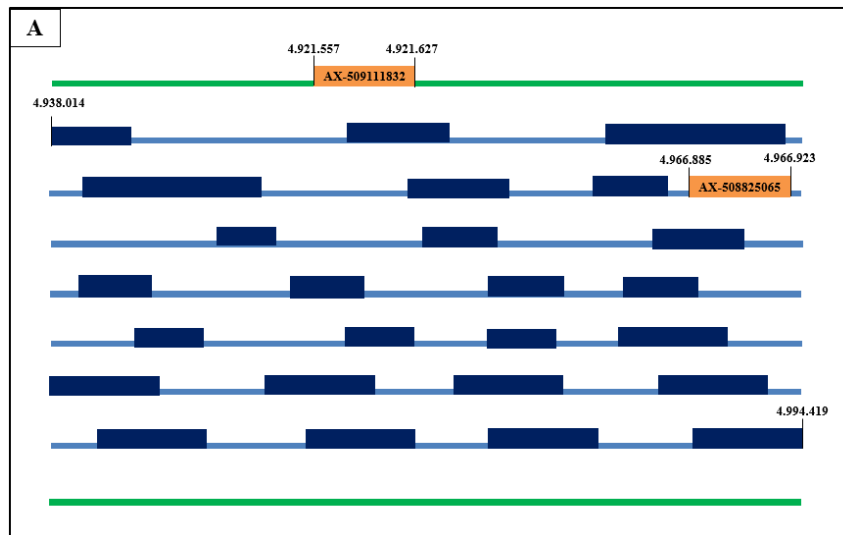


Figura 4.3: Alinhamento da sequência dos éxons do gene *znr2b* do tabaqui com o do peixe-zebra. As seqüências em roxo representam os *gaps* e o verde indica a presença de identidade.

O SNP AX-508825065 está localizado no íntron do gene *zgc:158766*. O SNP AX-509111832, foi encontrado em uma região próxima a esse mesmo gene (Figura 4.4A). Enquanto o AX-508832170 foi localizado no íntron do gene *LOC118799143* (Figura 4.4B). O gene *zgc:158766* não foi caracterizado e o *LOC118799143* é uma glicoproteína MAG (*Myelin associated glycoprotein*).



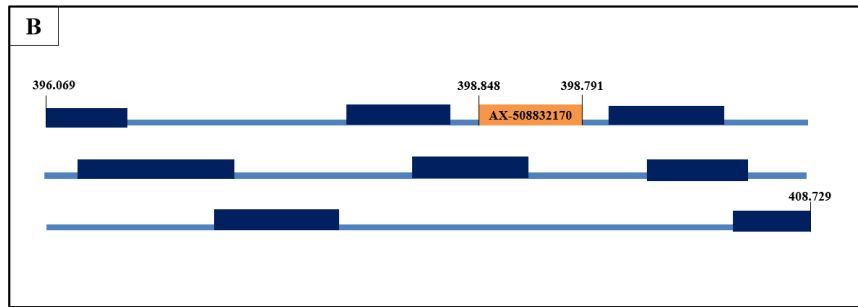


Figura 4.4: (A) Representação do gene *zgc:158766*. (B) Representação do gene *LOC118799143*. Ambos os genes foram encontrados *scaffold* NW_023494809.1 do NCBI. Os números indicam a localização das sequências de DNA. As sequências representam: azul claro – íntrons; azul escuro – éxons; verde – sequências antes e depois do gene; laranja – sondas dos SNPs associados ao sexo.

A sonda utilizada na genotipagem o SNP AX-508784292, que também apresentou associação com a determinação do sexo do tabaqui, foi mapeada no *scaffold* NW_023495214.1 (78.170 – 78.227pb - NCBI) com *query* e identidade de 100%. O gene mais próximo desse SNP é o hélice-alça-hélice proteína tipo 2 (*bHLH*), localizado na posição 15.524 – 15.663pb do mesmo *scaffold* (Figura 4.5A). A busca da sequência desse gene no genoma do *Piaractus mesopotamicus* identificou uma sequência correspondente no *scaffold* NW_023494784.1 com *query* de 100% e identidade de 86% (Figura 4.5B). Neste mesmo *scaffold*, foi localizado o *amplicon* 598710 do *P. mesopotamicus*, presente em uma região genômica específica encontrada exclusivamente em machos (Mascali et al., 2022) (Figura 4.5B).

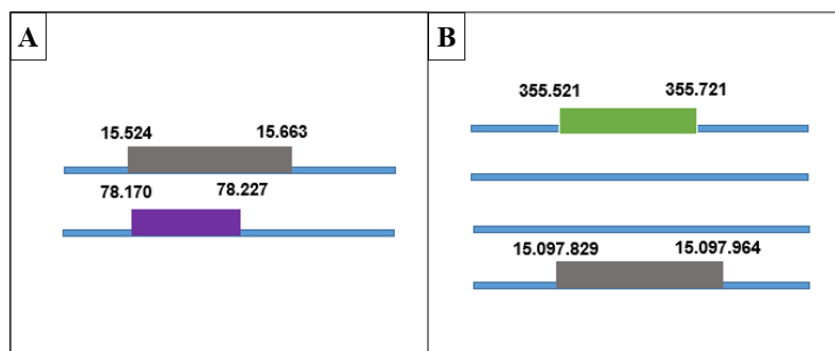


Figura 4.5: Representação dos *scaffolds* (A) NW_023495214.1 e (B) NW_023494784.1 do *Colossoma macropomum* encontrados no NCBI. Os números indicam a localização das sequências de DNA. As sequências representam: azul claro – genoma do tabaqui; cinza – gene hélice-alça-hélice proteína tipo 2 (*bHLH*); roxo: sonda Axiom AX-508784292; verde:

amplicon 598710 presente em uma região genômica específica presente apenas em machos em pacu descritos por (Mascali et al., 2022) .

Outros dois *amplicons* do pacu, presentes apenas em machos (Mascali et al., 2022), também foram alinhados com o genoma do tambaqui (Figura 4.6). Os *amplicons* 598710, 708218 e 242215B apresentaram *gaps* de 32, 49 e 23% e identidade de 66, 48 e 68%, respectivamente. Foi realizada uma busca das regiões genômicas do tambaqui alinhadas com os *amplicons* do pacu (regiões em verde na figura 4.6) em uma montagem específica do genoma de machos e fêmeas, no entanto, não houve nenhum alinhamento.

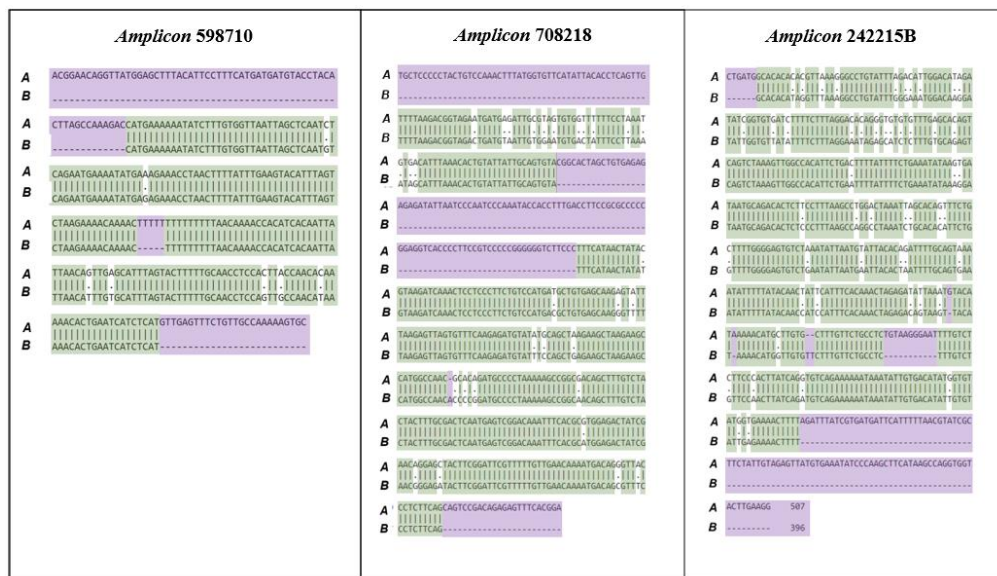


Figura 4.6: (A) *Amplicons* presentes em regiões genômicas específicas presentes apenas em machos em pacu (Mascali et al., 2022) alinhados com (B) genoma de *C. macropomum*. As sequências em roxo representam os *gaps* e o verde indica a presença de identidade.

4.3.2 Desenho dos primers, PCR e sequenciamento

Os genes *znrf2b* e *bHLH* bem como os éxons dos genes *fzd1* e *nod1*, localizados próximos a região genômica do *znrf2b* (Figura 4.7), foram selecionados como alvos para amplificação e sequenciamento. Iniciadores foram projetados em regiões flanqueantes dos éxons dos quatro genes, além de três íntrons específicos do gene *znrf2b* do tambaqui, com o intuito de encontrar novos SNPs associados a determinação do sexo. Além disso, foram projetados iniciadores nas mesmas regiões em que Varela et al. (2021) identificou SNPs relacionados ao sexo, bem como e em regiões genômicas do tambaqui que foram alinhadas com regiões sexo específicas de machos de pacu. No total foram desenvolvidos e testados 32 pares

de iniciadores. As sequencias de todos os pares de iniciadores estão descritas na Tabela 5.2 enquanto o detalhamento dos desenhos dos iniciadores pares dos genes *znrf2b*, *fzd1* e *nod1* estão apresentados na Figura 4.7.

Tabela 4.2: Sequências dos 32 primers desenhados com descrição das condições da PCR. Os traços (-) indicam os primers que não amplificaram.

Nome do iniciador	Sequência do primer	Tamanho do amplicon*	Temperatura de anelamento	Concentração do primer para PCR
CM_1_ <i>znrf2b</i> _fw	TTAATACCCACCGACCCCT	691	-	-
CM_1_ <i>znrf2b</i> _rv	ACTGCTGCTATCGCCACTAC			
CM_2_ <i>znrf2b</i> _fw	GCTGTTGCTCTGTTGTGGTG	678	-	-
CM_2_ <i>znrf2b</i> _rv	ACAAGCGATTTCCCTCCAGG			
CM_3_ <i>znrf2b</i> _fw	ATACACACACTCAGGGCAGC	657	62°C	2µM
CM_3_ <i>znrf2b</i> _rv	AAATGTGAACTTGCGACGCC			
CM_4_ <i>znrf2b</i> _fw	TGTGCTGGAATCTCCGTGTT	634	62°C	3µM
CM_4_ <i>znrf2b</i> _rv	TGACCGTTCCCATGGTTACT			
CM_5_ <i>znrf2b</i> _fw	ACTTGGTGGACTTCCCCTTT	187	62°C	2µM
CM_5_ <i>znrf2b</i> _rv	GGTTAACCCGCGATGTACCA			
CM_6_ <i>znrf2b</i> _fw	GGGCTCATATCCCTTACAATCA	606	50°C	3µM
CM_6_ <i>znrf2b</i> _rv	TCTGAAGGATGTTCAGGGCAC			
CM_7_ <i>znrf2b</i> _fw	ACGTGCTCTGATGGGAAAGC	600	62°C	1µM
CM_7_ <i>znrf2b</i> _rv	ATGTGTGTGAAGGCAGACGA			
CM_8_ <i>znrf2b</i> _fw	CGTCATGCAACGTCAGGAAG	574	-	-
CM_8_ <i>znrf2b</i> _rv	GCTGCGGGCTTTTTACCTTC			
CM_9_Cma5119693_fw	AGCTGAGTGAGGAGGCCTAA	505	64°C	3µM
CM_9_Cma5119693_rv	TTAACCTCTTCCTGCAGGCC			
CM_10_Cma5119452_fw	AAAGTGGCTGTAGCTGAGCT	505	64°C	2µM
CM_10_Cma5119452_rv	GACGTTGCACTACTCTCCA			
CM_11_Cma5117879_fw	GCTTGTTTTCACGCACCGAT	531	58°C	2µM
CM_11_Cma5117879_rv	AAAATCACCTGCAGGCTGGA			
CM_12_Cma5145911_fw	AATTGCTGTCAGGCAGTTGC	577	-	-
CM_12_Cma5145911_rv	GCTGGATTTTTGCCACGTAAC			
CM_13_ <i>bHLH</i> _fw	TCCCTAAAAGAACAGTTGAGCT	585	58°C	2µM
CM_13_ <i>bHLH</i> _rv	GACCCGGAAATGCTCCTCAA			
CM_14_ <i>fzd1</i> _fw	GTGAGCGCCATGACCTTACT	595	62°C	2µM
CM_14_ <i>fzd1</i> _rv	CCAGGAAGCGGTAGTTGAGG			
CM_15_ <i>fzd1</i> _fw	TGTGTGTGGGTCAGAATGCA	552	-	-
CM_15_ <i>fzd1</i> _rv	CCAGGATCACCCACCAGATG			
CM_16_ <i>fzd1</i> _fw	GACAATGAGTTCCGGACGGT	508	-	-
CM_16_ <i>fzd1</i> _rv	AGTAGCAGGCGATGACGATG			
CM_17_ <i>fzd1</i> _fw	CCAAGACGGAGAAGCTGGAG	580	-	-
CM_17_ <i>fzd1</i> _rv	CGTCGGAACCTCAGAAGTCTGT			
CM_18_ <i>nod1</i> _fw	TTTCTGGATGACGTGACGGG	525	-	-

CM_18_nod1_rv	CAGAGCGGTTTCAGAGTGGTT			
CM_19_nod1_fw	TTGCTGGCCAGACCTTCAAAA	535	60°C	2µM
CM_19_nod1_rv	GTCTTTCGGCGAATGGCATC			
CM_20_nod1_fw	GGCTGCTTAATGGTGCCTTT	585	62°C	2µM
CM_20_nod1_rv	CAGCCAAGTTCACACATGCA			
CM_21_nod1_fw	AACCAACCCATCTCCTCCCT	520	-	-
CM_21_nod1_rv	AGCCAAGTATACTGTAGGGTACT			
CM_22_nod1_fw	GGGGCCAGTTTATAGTCCCAAG	501	60°C	3µM
CM_22_nod1_rv	CCAGAGAACTCATCAGGCACA			
CM_23_nod1_fw	CTTGTCCAGCCCAGTTCCTT	519	60°C	3µM
CM_23_nod1_rv	CGTGCCAGAGATACAGACCC			
CM_24_nod1_fw	CTGCGTTGGTTTTGGACAGG	548	-	-
CM_24_nod1_rv	TCCAGACTCTTGCATCACCC			
CM_25_nod1_fw	GCTCCTCTTCAGCAGTCCAG	541	64°C	2µM
CM_25_nod1_rv	CAGCGAGGTCTTCAGGTACA			
CM_26_nod1_fw	GGTCCCCATCTGGATAGCAG	507	-	-
CM_26_nod1_rv	GTAGAGCAAACGGTCCTGGG			
CM_27_nod1_fw	GCAGAAGGCATTCAAACGCA	668	64°C	2µM
CM_27_nod1_rv	TCGTCCACCCCTAGCCTTTA			
CM_28_nod1_fw	AGTAAGGCCTGGGAGTGAGA	579	-	-
CM_28_nod1_rv	CGCTTTTCTCTCCTGCTCGA			
CM_29_bHLH_fw	ACATTAGGATGTTAGTGTGGACA	602	60°C	3µM
CM_29_bHLH_rv	CACATCCGAGTTGAGGCCTT			
CM_30_bHLH_fw	ACAGTGTATCCAGTTAAAGGACA	505	58°C	3µM
CM_30_bHLH_rv	TAGATGATGCTCAGCCCGGA			
CM_31_708218_fw	TTTCCAGCCGTTTTGCCATG	592	-	-
CM_31_708218_rv	TGTCCCTGGAAGCTCAGTCT			
CM_32_242215_fw	TGCTGGCACACTTCTGGAAT	627	58°C	3µM
CM_32_242215_rv	TTTCGACCAACAGACCCCTG			

*Tamanho esperado em pares de bases.



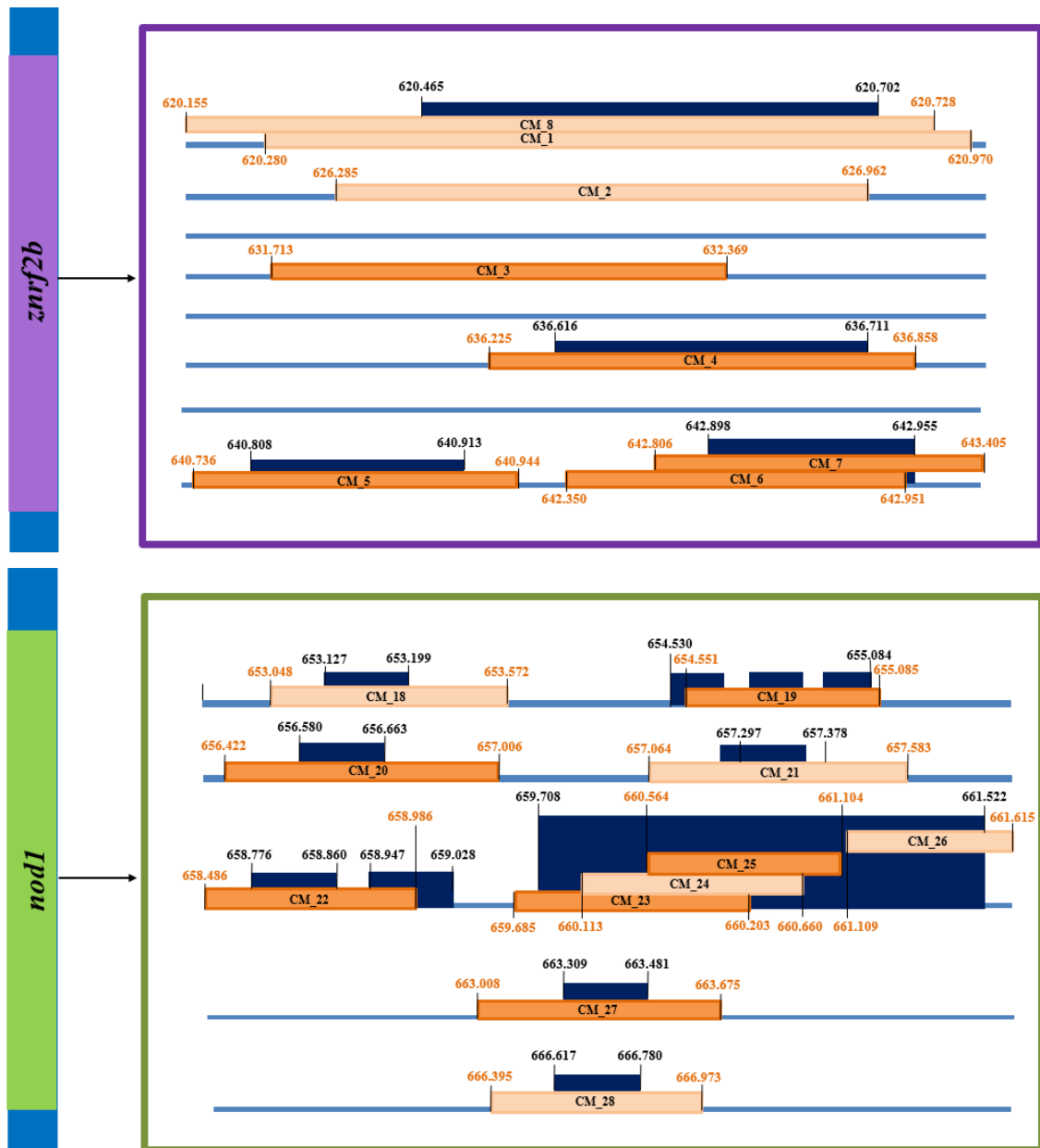


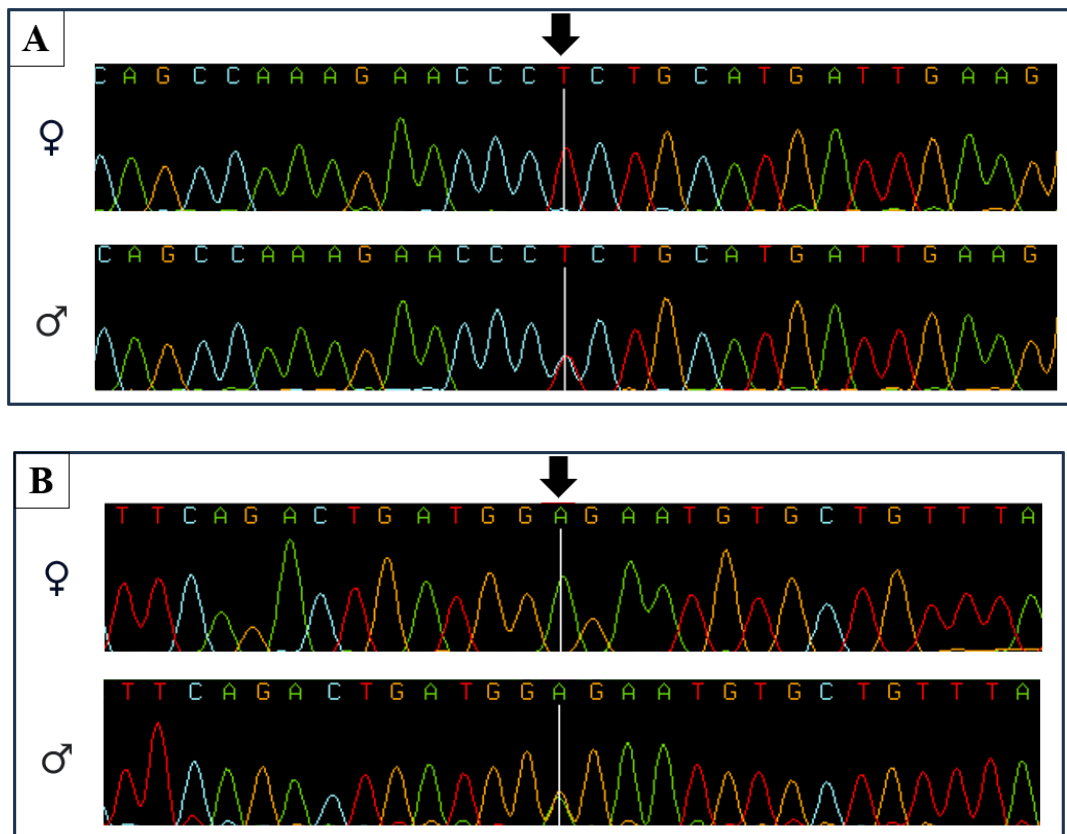
Figura 4.7: Representação dos genes *fzd1*, *znr2b* e *nod1* do *Colossoma macropomum* localizado no *scaffold* NW_023494809.1 do NCBI. Os números indicam a localização das seqüências de DNA. As seqüências detalhadas de cada gene representam: azul claro – íntrons; azul escuro – éxons; laranja escuro - primers desenhados que amplificaram; laranja claro – primers desenhados que não amplificaram. *znr2b*: CM_01 a CM_8; *fzd1*: CM_14 a CM_17; *nod1*: CM_18 a CM_28.

No gene *znr2b* foram identificados 31 SNPs. No entanto, os iniciadores CM_01 e CM_02 não resultaram em nenhuma amplificação. Como alternativa, novos iniciadores foram projetados para o Exons 1 ((CM_08, Figura 4.7), mas também não apresentaram sucesso. Entre os 31 SNPs detectados no gene *znr2b*, quatro, CM_03_436, CM_03_489, CM_03_555 e CM_07_1122, demonstraram maior associação com a determinação do sexo, com acurácia

variando de 74 a 96%. Todos esses marcadores apresentaram genótipos homocigotos para fêmeas e heterocigotos para machos (Tabela 4.3 e Figura 4.8A, B, C e D).

No gene *fzdl*, houve sucesso na amplificação utilizando o par de iniciadores CM_14; no entanto, nenhum SNP relacionado ao sexo foi identificado (Figura 4.7).

Para o gene *nod1*, 11 pares de iniciadores foram projetados, desses, seis (CM_19, CM_20, CM_22, CM_23, CM_25 e CM_27) amplificaram a região do genoma de interesse. O marcador CM_25_632 apresentou acurácia de 96% em determinar o sexo. Esse SNP está localizado no éxon do gene *nod1*, e resulta em uma variação no códon do RNAm (TGC e TGT) (Figura 4.8E), no entanto trata-se de uma substituição sinônima uma vez em que ambas as trincas codificam o mesmo aminoácido, a cisteína. Nos genes *nod1* e *znr2b* foram encontrados vários *indels*, mas nenhum estava relacionado ao sexo.



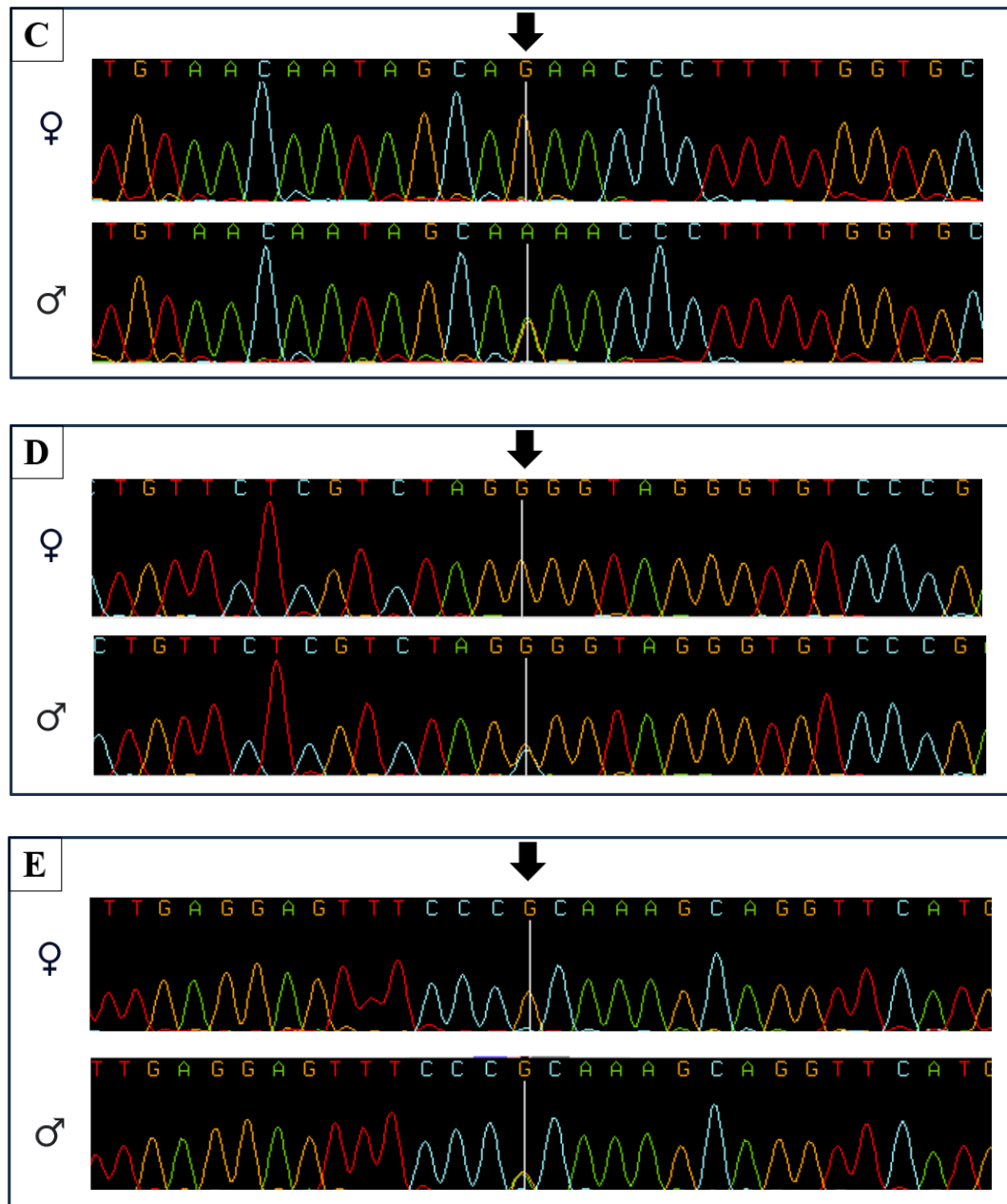


Figura 4.8: Genótipo de SNPs em indivíduos machos e fêmeas identificados por sequenciamento. (A) CM_03_436; (B) CM_03_489; (C) CM_03_555; (D) CM_07_1122; (E) CM_25_632. (♀) fêmea e (♂) macho. As setas pretas indicam a localização dos loci de SNP.

As PCRs realizadas com as 24 amostras (12 fêmeas e 12 machos), utilizando os iniciadores CM_13 localizados no íntron e no éxon do gene *bHLH*, resultaram em amplificação para 11 machos e apenas uma fêmea. Com base nesses resultados, PCRs adicionais foram realizadas com 188 amostras (95 fêmeas e 93 machos) (Figura 4.9). A amplificação ocorreu somente em oito fêmeas e em 84 machos, alcançando assim a acurácia de 85% para prever o sexo corretamente. Outros dois iniciadores (CM_29 e CM_30) foram desenhados nessa região para sequenciar e identificar diferenças nas sequências entre os machos e as fêmeas (Figura

4.10). CM_29 apresentou amplificação em uma fêmea e em todos os machos, enquanto CM_30 amplificou uma tênue banda em seis fêmeas. Posteriormente, PCRs com CM_29 foram realizadas utilizando o conjunto ampliado de 188 amostras, resultando em uma acurácia de 89% (Figura 4.11).

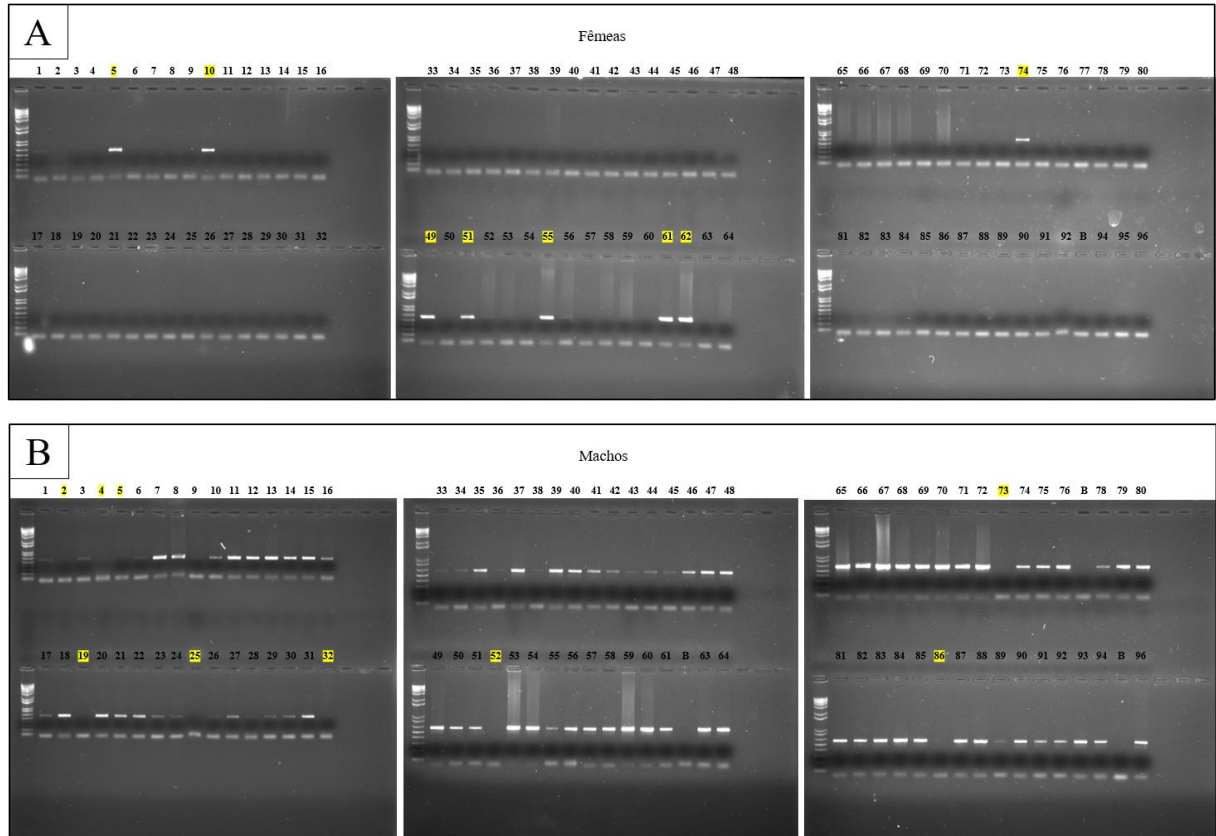


Figura 4.9: Géis dos produtos de PCR, feitas com os primers CM_13, de 95 fêmeas (A) e 93 machos (B) de tambaqui (*Colossoma macropomum*). As amostras destacadas em amarelo indicam resultados diferentes do previsto (ausência de bandas em machos e presença de bandas em fêmeas).



Figura 4.10: Sequência da região genômica do tambaqui em que os primers CM_13, CM_29 e CM_30 foram desenhados. A sequência em azul é o éxon do gene helix-loop-helix proteína tipo 2 (*bHLH*).

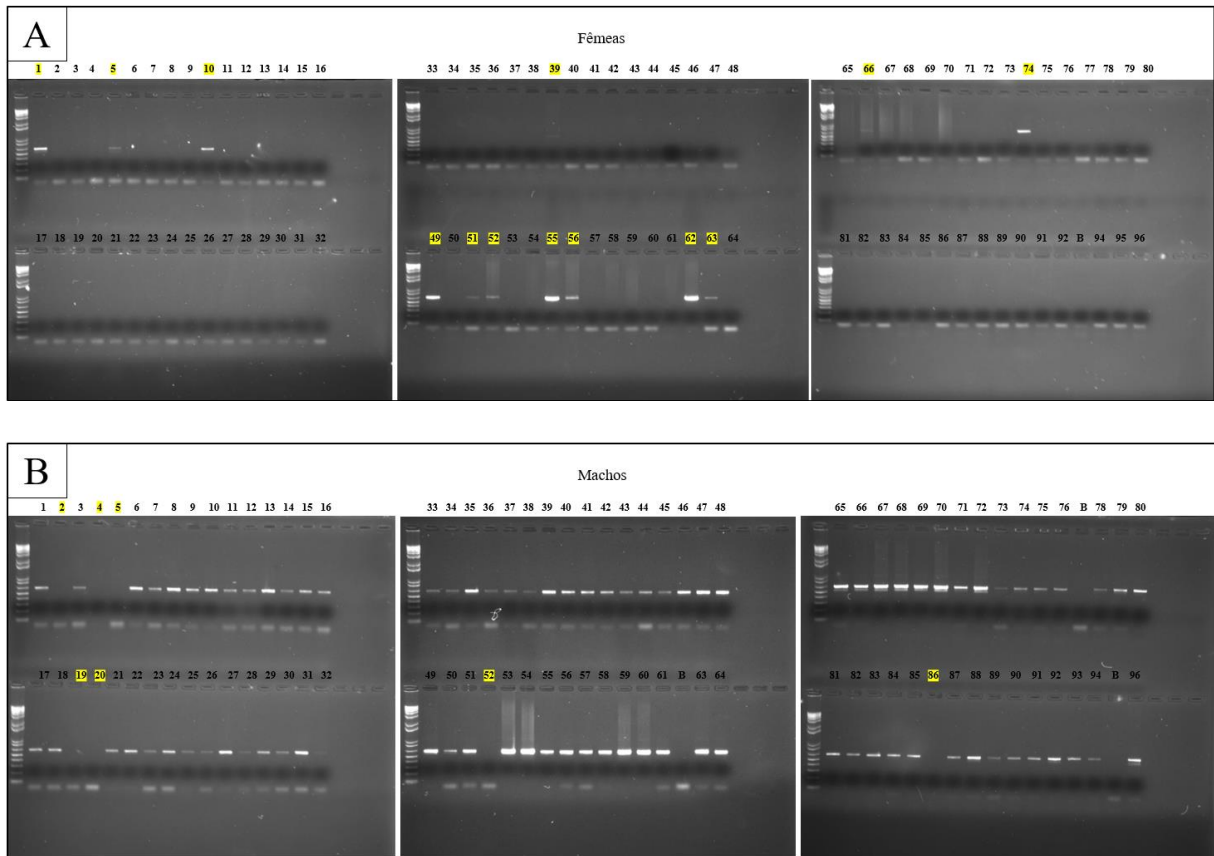


Figura 4.11: Géis dos produtos de PCR, feitas com os primers CM_29, de 95 fêmeas (A) e 93 machos (B) de tambaqui (*Colossoma macropomum*). As amostras destacadas em amarelo indicam resultados diferentes do previsto (ausência de bandas em machos e presença de bandas em fêmeas).

Os iniciadores CM_09 a CM_12 foram desenvolvidos para identificar quatro SNPs associados ao sexo no tambaqui, previamente publicados por Varela et. al (2021), e para comparar a acurácia obtida no presente trabalho com os resultados do estudo original. Dentre os SNPs investigados, dois foram identificados: CM_09_Cma5119693_497 e CM_10_Cma5119452_702, com acurácias de 74% e 60%, respectivamente, valores inferiores aos relatados por Varela et al (2021).

Os primers CM_31 e CM_32 foram desenhados para identificar regiões sexo específicas em tambaqui, com base na região SDR descrita em pacu. Mascali et al. (2022) identificou três regiões específicas de machos em *P. mesopotamicus*, porém, foi possível desenvolver iniciadores apenas para duas regiões no genoma do tambaqui. A análise

comparativa indicou que a sequência equivalente ao *scaffold 598710* do pacu encontra-se duplicada em *C. macropomum*. A amplificação foi realizada com sucesso somente para o marcador CM_32, no entanto, o sequenciamento não apresentou dados satisfatórios.

4.3.3 Estudo de Associação Genômica Ampla com SNPs descoberto e com painel Axiom SerraSNP

No total, foram encontrados 82 SNPs nos *amplicons* resultantes dos 19 pares de primers. A análise GWAS foi conduzida utilizando as 24 amostras que possuíam dados do conjunto completo de marcadores, ou seja, os 21.447 do Axiom SerraSNP e os recém descobertos. A Tabela 4.3 resume os resultados e a Figura 4.12 demonstra o gráfico de Manhattan. Em relação aos SNPs do painel de média densidade, observou-se que o AX-508832278 apresentou um dos maiores valores de acurácia, assim como foi observado em estudo realizado previamente.

Tabela 4.3: Marcadores significativamente associados ao sexo obtidos com o conjunto de 24 amostras e 21.529 SNPs.

SNPs	Grupo de Ligação	Posição	LOD	Acurácia	Macho	Fêmea
CM_03_436	26	632.046	3,95	90%	C/T	C/C
CM_03_489	26	632.100	0,04	74%	A/G	A/A
CM_03_555	26	632.166	9,10	96%	A/G	A/A
CM_07_1122	26	643.092	5,91	88%	G/C	G/G
CM_25_632	26	660.941	5,91	96%	A/G	G/G
AX-508832278	26	622.764	4,27	94%	G/T	T/T
AX-508825065	26	4.966.888	0,00	64%	C/G	C/C
AX-508784292	-	-	0,00	67%	A/T	A/A
AX-509111832	26	4.921.591	0,04	65%	A/G	G/G
AX-508832170	26	398.815	0,68	55%	A/G	A/A

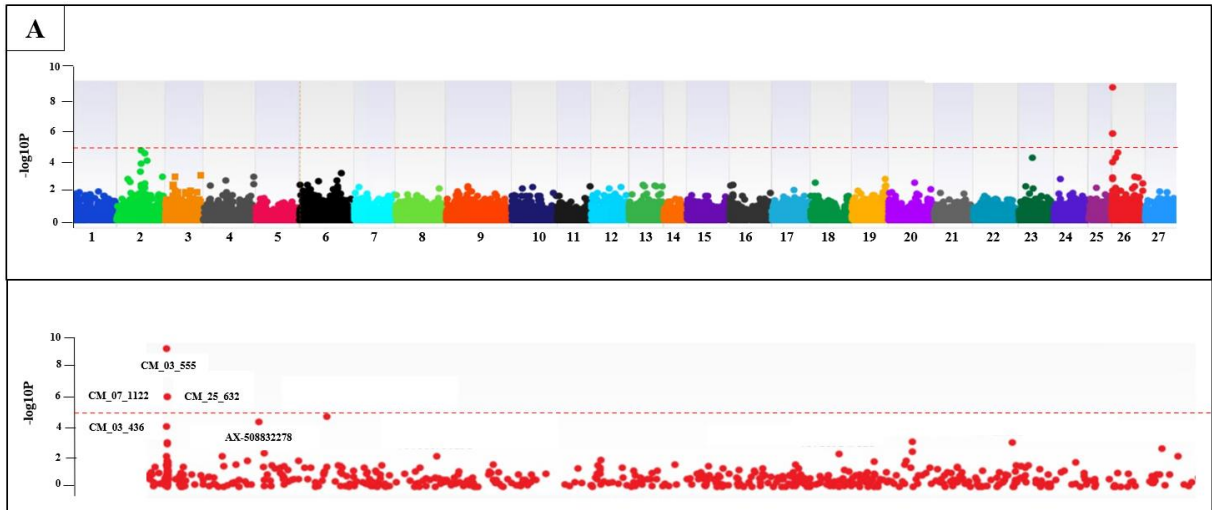


Figura 4.12: Gráfico de Manhattan para análise GWAS. A pontuação de $-\log_{10}P$ para associação de SNPs genotipados é plotada em função da posição do mapa genético. Cada grupo de ligação foi representado com SNPs de cores diferentes. O conjunto de dados foi analisado com 24 amostras e 21.529 SNPs. A figura abaixo do gráfico de Manhattan está demonstrado os SNPs do grupo de ligação 26. A linha pontilhada vermelha indica o limite significativo.

4.4 DISCUSSÃO

O presente estudo identificou regiões genômicas associadas ao sexo no *C. macropomum*. Para tanto, foi necessário encontrar o grupo de ligação e as posições dos SNPs significativamente associados a determinação do sexo; realizar análises de genômica comparativa; sequenciar genes MSD candidatos com o método Sanger. Nos últimos anos as tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (NGS, *Next Generation Sequencing*) tem sido amplamente utilizada para identificar marcadores sexuais em peixes (Gong et al., 2022). No entanto, alguns fatores impossibilitaram que metodologias mais recentes fossem utilizadas na execução deste trabalho, como por exemplo, a necessidade de DNA de altíssima qualidade, maior custo em comparação ao método utilizado e maior tempo para obtenção dos resultados (Yin et al., 2018). Apesar do uso de tecnologias mais antigas, foi possível identificar alguns genes associados a determinação do sexo, uma vez que a análise de associação do genoma completo (GWAS) realizada no Capítulo III com os dados genotípicos do painel de média densidade Axiom SerraSNP já havia revelado pequenas regiões de DNA com potencial relevância para o tema.

Análises de genômica comparativas foram realizadas inicialmente com foco nas sequências do gene *znrf2b* do tabaqui e do peixe zebra. Segundo Nunes et al. (2017) existe um alto nível de conservação genômica entre o tabaqui e o peixe zebra para a maioria dos grupos de ligação. Além disso, no alinhamento dos éxons do gene do *C. macropomum* com o genoma do *D. rerio* ocorreu no grupo de ligação (GL) 16 desta espécie modelo, o que corrobora a sintenia observada por Nunes et al. (2017) entre os GL 26 e 16 das duas espécies. Ainda não existem pesquisas sobre genômica comparativa entre *C. macropomum* e *H. sapiens*, mas foram encontrados estudos feitos entre humanos e outras espécies de teleósteos. Woods et al. (2005) fizeram uma análise comparativa do genoma humano com *Tetraodon nigroviridis* e *D. rerio* e definiram numerosas regiões de sintenia conservada. Foi sugerido que o ancestral comum dos

vertebrados tinha um genoma composto por 12 cromossomos e o mapeamento comparativo dos genomas das três espécies indicou a presença do conteúdo genético de 11 desses 12 cromossomos ancestrais propostos. Além disso, *D. rerio* tem cerca de 26.000 genes codificadores de proteínas e a comparação com o genoma de referência humano mostra que aproximadamente 70% dos genes humanos têm pelo menos um ortólogo óbvio do peixe-zebra (Howe et al., 2013). Sendo assim, esses estudos indicam que existe uma conservação entre o genoma humano e o dos teleósteos.

Descobertas interessantes foram obtidas em estudos com o gene *znrf3* em vertebrados. Harris et al. (2018) revelaram que, em mamíferos, o gene *znrf3* tem um papel determinante dos testículos. Rjiba et al. (2023) identificaram que uma criança do sexo feminino com disgenesia gonadal completa 46, XY (distúrbio do desenvolvimento sexual associada a anomalias do desenvolvimento gonadal que resultam na presença de genitais femininos externos e internos, apesar do cariótipo 46, XY) carregava uma variante patogênica rara no gene *znrf3*. Além disso, este gene foi um candidato para determinação do sexo em *Betta splendens* (Panthum et al., 2022).

Além do SNP AX-508832278, localizado no íntron do gene *znrf2b*, o AX-508784292 também foi associado ao sexo, sendo que este foi encontrado em um *scaffold* em que o gene hélice-alça-hélice proteína tipo 2 (*bHLH*) estava presente (Figura 4.5). As *bHLH* são uma superfamília de fatores de transcrição que são encontradas em várias espécies, desde a levedura *Saccharomyces cerevisiae* até humanos (Zhao et al., 2018), e funcionam em processos críticos de desenvolvimento como a determinação do sexo. Bhandari et al. (2011) levantaram a hipótese que o gene determinante do sexo *Sry* se liga ao promotor do gene *bHLH* e ativa a expressão gênica para ocorrer uma cascata de eventos associados à diferenciação das células de Sertoli e ao desenvolvimento embrionário dos testículos em camundongos. Já Li et al. (2014) procuraram compreender a hierarquia regulatória do gene para *Sry* e *Sox9* e constataram que o *Sry* se liga a vários genes de diferenciação ovariana e reprime sua ativação por meio da sinalização *Wnt/β-catenina*. Lobo et al. (2020) fizeram um estudo do transcriptoma no tambaqui durante a diferenciação das gônadas e os resultados mostraram que antes da diferenciação, componentes da via *Wnt/β-catenina*, genes *fox* e *fst* imprimem o desenvolvimento do sexo feminino, enquanto vias antagônicas (*gsk3b*, *wt1* e *fgfr2*), *sox9* e genes para síntese de andrógenos indicam diferenciação masculina. Tais descobertas indicam que o gene *bHLH* pode estar relacionado com essa cascata descoberta por Lobo et al. (2020).

É possível que os genes *znrf2b* e *bHLH* ajam em conjunto na cascata genética de determinação e diferenciação do sexo em tambaqui. Tamura et al. (2001) sugeriram que *bHLH* é expresso em um padrão intimamente relacionado, mas principalmente complementar ao da expressão *Ad4BP/SF-1* na gônada em desenvolvimento em camundongos e o *Ad4BP/SF-1* codifica um fator de transcrição do gene dedo de zinco (zf).

O gene candidato *frizzled* (*fzds*), que é um dos principais receptores da proteína *Wnt*, tem um único éxon com 1629 pb no tambaqui. Foram desenhados quatro iniciadores nessa região, no entanto, houve amplificação somente quando o CM_14 foi utilizado (Figura 5.1). Isso pode ter ocorrido devido a mutações desconhecidas presentes na região no éxon do *fdz1* à qual os *primers* anelam.

No gene *nod1* foi identificado um SNP localizado em um éxon (CM_25_632) que apresentou acurácia de 96% para a determinação do sexo nas amostras estudadas. Alguns estudos feitos com teleostes (Chen et al., 2021; T. Li et al., 2018; Zhang et al., 2018) demonstraram que os receptores do tipo *NOD* ou *NLRs* (*NOD-like Receptors*) atuam com outros receptores para orquestrar uma resposta imune eficiente do hospedeiro contra invasões microbianas e sinais de perigos endógenos, no entanto a função dos genes *NLRs* ainda é pouco compreendida em peixes (Chuphal et al., 2022; Sahoo, 2020). Uma pesquisa do neurotranscriptoma do tambaqui demonstrou que dentre os transcritos expressos diferentemente entre machos e fêmeas, existem genes candidatos relacionados a resposta imune, como o *NLRC3* e *NLRP3* (Miranda et al., 2024). Essa não seria a primeira vez que um gene do sistema imune estaria relacionado com a determinação e diferenciação do sexo em espécies aquícolas. O gene *IRF-9* que tem função relacionada ao sistema imunológico foi considerado o ancestral do *Sdy*, gene mestre (MSD) descoberto em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* (Yano et al., 2012).

Ferramentas moleculares têm sido utilizadas para identificação do sexo para obter populações monossexuais quando ocorrem dimorfismos sexuais relacionados a características produtivas, como o crescimento (Niu et al., 2024). Uma forma eficaz de desenvolver essas ferramentas é encontrando SNPs ou regiões sexo específicas localizados em potenciais genes determinantes do sexo. O sequenciamento permitiu identificar um SNP localizado em um éxon, no entanto, a substituição de base encontrada não altera o aminoácido do *nod1*. Outros estudos tiveram êxito utilizando essa estratégia. Em *Takifugu rubripes*, por exemplo, um SNP (C/G) foi localizado no éxon do gene *Amhr2*, em que as fêmeas apresentam genótipo homocigoto e os machos heterocigoto. Esse polimorfismo altera um aminoácido que

resulta em fêmeas His/His e machos His/Asp. Logo, o sexo dessa espécie provavelmente é determinado pela combinação de dois alelos de *Amhr2* (Kamiya et al., 2012).

No presente estudo, foram encontrados cinco SNPs associados ao sexo que corroboram com o sistema de determinação genético XX/XY (Tabela 4.3), assim como foi proposto anteriormente (Varela et al. 2021). Além disso, os iniciadores desenvolvidos para o éxon do gene *bHLH* amplificaram o fragmento de DNA principalmente nos machos (Figuras 4.9 e 4.11). Os marcadores do tipo SNP que apresentaram maior acurácia estão localizados nos íntrons do gene *znrf2b* (AX-508832278 - descoberto em um estudo prévio e CM_03_555) e no éxon do *nod1* (CM_25_632). Apesar de não terem sido encontrados SNPs que alterem os aminoácidos, algum desses genes pode ser o mestre da determinação do sexo em tabaqui. É importante considerar que não foi possível sequenciar todos os éxons desses genes devido à ausência de amplificação das sequências-alvo (dentre os 26 iniciadores desenvolvidos, somente 15 amplificaram com sucesso). Sendo assim, a realização de estudos complementares que explorem ainda mais essas regiões para compreender melhor os mecanismos de determinação e diferenciação do sexo em tabaqui ainda se faz necessária.

REFERÊNCIAS

- Almeida, F. L., Lopes, J. S., Crescencio, R., Izel, A. C. U., Chagas, E. C., & Bojjink, C. (2016). Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, 452, 224–232.
- Bhandari, R. K., Sadler-Riggelman, I., Clement, T. M., & Skinner, M. K. (2011). Basic helix-loop-helix transcription factor TCF21 is a downstream target of the male sex determining gene SRY. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019935>
- Cáceres, G., López, M. E., Cádiz, M. I., Yoshida, G. M., Jedlicki, A., Palma-Véjares, R., Travisany, D., Díaz-Domínguez, D., Maass, A., Lhorente, J. P., Soto, J., Salas, D., & Yáñez, J. M. (2019). Fine Mapping Using Whole-Genome Sequencing Confirms Anti-Müllerian Hormone as a Major Gene for Sex Determination in Farmed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9, 3213–3223.
- Chen, Z., Xu, X., Wang, J., Zhou, Q., & Chen, S. (2021). A genome-wide survey of NOD-like receptors in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*): Identification, characterization and expression analysis in response to bacterial infection. *Journal of Fish Biology*, 99(6), 1786–1797.
- Chuan, J., Li, W., Pan, S., Jiang, Z., Shi, J., & Yang, Z. (2024). Progress in the development of modulators targeting Frizzleds. In *Pharmacological Research* (Vol. 206). Academic Press.
- Chuphal, B., Rai, U., & Roy, B. (2022). Teleost NOD-like receptors and their downstream signaling pathways: A brief review. In *Fish and Shellfish Immunology Reports* (Vol. 3). Elsevier Ltd.
- Cui, Z., Liu, Y., Wang, W., Wang, Q., Zhang, N., Lin, F., Wang, N., Shao, C., Dong, Z., Li, Y., Yang, Y., Hu, M., Li, H., Gao, F., Wei, Z., Meng, L., Liu, Y., Wei, M., Zhu, Y., ... Chen, S. (2017). Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep42213>
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2022). *Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences*. www.elsevier.com/locate/aqua-online

- Fernandino, J. I., & Hattori, R. S. (2019). Sex determination in Neotropical fish: Implications ranging from aquaculture technology to ecological assessment. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 273, pp. 172–183). Academic Press Inc.
- Gordon, D. (2003). *Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed*. <http://www.phrap.org>
- Harris, A., Siggers, P., Corrochano, S., Warr, N., Sagar, D., Grimes, D. T., Suzuki, M., Burdine, R. D., Cong, F., Koo, B. K., Clevers, H., Stévant, I., Nef, S., Wells, S., Brauner, R., Rhouma, B. Ben, Belguith, N., Eozenou, C., Bignon-Topalovic, J., ... Greenfield, A. (2018). ZNRF3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(21), 5474–5479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801223115>
- Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., Fernandino, J. I., Somoza, G. M., Yokota, M., & Struśsmann, C. A. (2012). A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(8), 2955–2959.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498–503.
- IBGE. (2024). Produção da Pecuária Municipal 2023. *Imprensa Oficial*.
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., & Kikuchi, K. (2012). A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics*, *8*(7).
- Kitano, J., Ansai, S., Takehana, Y., & Yamamoto, Y. (2023). *Diversity and Convergence of Sex-Determination Mechanisms in Teleost Fish*. [https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021122-](https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021122-021122-)
- Li, J. Z., Liu, S. J., & Nagahama, Y. (2011). Pod1 is involved in the sexual differentiation and gonadal development of the Nile tilapia. *Science China Life Sciences*, *54*(11), 1005–1010.
- Li, T., Shan, S., Wang, L., Yang, G., & Zhu, J. (2018). Identification of a fish-specific NOD-like receptor subfamily C (NLRC) gene from common carp (*Cyprinus carpio* L.): Characterization, ontogeny and expression analysis in response to immune stimulation. *Fish and Shellfish Immunology*, *82*, 371–377.
- Li, Y., Zheng, M., & Lau, Y. F. C. (2014). The sex-determining factors SRY and SOX9 regulate similar target genes and promote testis cord formation during testicular differentiation. *Cell Reports*, *8*(3), 723–733.
- Lobo, I. K. C., Nascimento, Á. R. do, Yamagishi, M. E. B., Guiguen, Y., Silva, G. F. da, Severac, D., Amaral, A. da C., Reis, V. R., & Almeida, F. L. de. (2020). Transcriptome of tambaqui *Colossoma macropomum* during gonad differentiation: Different molecular signals leading to sex identity. *Genomics*, *112*(3), 2478–2488.

- Mascali, F. C., Posner, V. M., Romero Marano, E. A., del Pazo, F., Hermida, M., Sánchez, S., Mazzoni, T. S., Martinez, P., Rubiolo, J. A., & Villanova, G. V. (2022). Development and validation of sex-specific markers in *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*, 558.
- Miranda, J., Veneza, I., Ferreira, C., Santana, P., Lutz, I., Furtado, C., Pereira, P., Rabelo, L., Guerreiro-Diniz, C., Melo, M., Sampaio, I., Vallinoto, M., & Evangelista-Gomes, G. (2024). First neurotranscriptome of adults Tambaquis (*Colossoma macropomum*) with characterization and differential expression between males and females. *Scientific Reports*, 14(1).
- Mustapha, U. F., Jiang, D. N., Liang, Z. H., Gu, H. T., Yang, W., Chen, H. P., Deng, S. P., Wu, T. L., Tian, C. X., Zhu, C. H., & Li, G. L. (2018). Male-specific *Dmrt1* is a candidate sex determination gene in spotted scat (*Scatophagus argus*). *Aquaculture*, 495, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.009>
- Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191(1), 163–170. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.137497>
- Niu, J. S., Wang, T., Li, Z., Wang, Z. W., Ding, M., Wang, M. T., Lian, Z. Q., Mei, J., Wang, Y., Zhou, L., Zhang, X. J., Gui, J. F., & Li, X. Y. (2024). Efficient breeding and growth advantage of all-male population in Lanzhou catfish (*Silurus lanzhouensis*). *Aquaculture*, 578.
- Nunes, J. de R. da S., Liu, S., Pértille, F., Perazza, C. A., Villela, P. M. S., De Almeida-Val, V. M. F., Hilsdorf, A. W. S., Liu, Z., & Coutinho, L. L. (2017). Large-scale SNP discovery and construction of a high-density genetic map of *Colossoma macropomum* through genotyping-by-sequencing. *Scientific Reports*, 7.
- Panthum, T., Jaisamut, K., Singchat, W., Ahmad, S. F., Kongkaew, L., Wongloet, W., Dokkaew, S., Kraichak, E., Muangmai, N., Duengkae, P., & Srikulnath, K. (2022). Something Fishy about Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*) Sex: Polygenic Sex Determination or a Newly Emerged Sex-Determining Region? *Cells*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/cells11111764>
- Quéméré, E., Perrier, C., Besnard, A. L., Evanno, G., Baglinière, J. L., Guiguen, Y., & Launey, S. (2014). An improved PCR-based method for faster sex determination in brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Conservation Genetics Resources*, 6(4), 825–827.
- Rjiba, K., Mougou-Zerelli, S., Hamida, I. hadj, Saad, G., Khadija, B., Jelloul, A., Slimani, W., Hasni, Y., Dimassi, S., khelifa, H. Ben, Sallem, A., Kammoun, M., Abdallah, H. H., Gribaa, M., Bignon-Topalovic, J., Chelly, S., Khairi, H., Bibi, M., Kacem, M., ... McElreavey, K. (2023). Additional evidence for the role of chromosomal imbalances and *SOX8*, *ZNRF3* and *HHAT* gene variants in early human testis development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-022-01045-7>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). *Integrative genomics viewer*. <http://maq.sourceforge.net/>
- Sahoo, B. R. (2020). Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR). In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 161, pp. 1602–1617). Elsevier B.V.

- Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. (2007). A novel transforming growth factor- β superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental Biology*, 301(1), 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.001>
- Sember, A., Nguyen, P., Perez, M. F., Altmanová, M., Ráb, P., & Cioffi, M. D. B. (2021). Multiple sex chromosomes in teleost fishes from a cytogenetic perspective: State of the art and future challenges. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 376, Issue 1833). Royal Society Publishing.
- Tamura, M., Kanno, Y., Chuma, S., Saito, T., & Nakatsuji, N. (2001). *Pod-1/Capsulin shows a sex-and stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF-1*. www.elsevier.com/locate/mode
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15).
- Varela, E. S., Bekaert, M., Ganeco-Kirschnik, L. N., Torati, L. S., Shiotsuki, L., de Almeida, F. L., Villela, L. C. V., Rezende, F. P., da Silva Barroso, A., de Freitas, L. E. L., Taggart, J. B., & Migaud, H. (2021). A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*. *BMC Genomics*, 22(709).
- Wang, L., Zhu, Y., Xu, W., Shao, C., Dong, Z., Li, H., Cui, Z., Meng, L., Guo, H., Tian, Y., & Chen, S. (2017). Molecular characterization of Pod1 during sex development in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(3–4), 714–718. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.126>
- Wang, Y., Chen, Y., Cao, M., Wang, X., Wang, G., & Li, J. (2021). Identification of wnt2 in the pearl mussel *Hyriopsis cumingii* and its role in innate immunity and gonadal development. *Fish and Shellfish Immunology*, 118, 85–93.
- Weise, E. M., Van Wyngaarden, M., Den Heyer, C., Mills Flemming, J., Kess, T., Einfeldt, A. L., Fisher, J. A. D., Ditta, R., Pare, G., & Ruzzante, D. E. (2023). SNP Panel and Genomic Sex Identification in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Marine Biotechnology*, 25(4), 580–587.
- Woods, I. G., Wilson, C., Friedlander, B., Chang, P., Reyes, D. K., Nix, R., Kelly, P. D., Chu, F., Postlethwait, J. H., & Talbot, W. S. (2005). The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Research*, 15(9), 1307–1314.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22(15), 1423–1428.
- Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., & Guiguen, Y. (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*, 6(3), 486–496. <https://doi.org/10.1111/eva.12032>
- Zhang, L., Gao, Z., Yu, L., Zhang, B., Wang, J., & Zhou, J. (2018). Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors in teleost fish: Current knowledge and future

perspectives. In *Journal of Fish Diseases* (Vol. 41, Issue 9, pp. 1317–1330). Blackwell Publishing Ltd.

Zhao, F., Li, G., Hu, P., Zhao, X., Li, L., Wei, W., Feng, J., & Zhou, H. (2018). Identification of basic/helix-loop-helix transcription factors reveals candidate genes involved in anthocyanin biosynthesis from the strawberry white-flesh mutant. *Scientific Reports*, 8(1).

CONCLUSÃO

No presente estudo, foram encontrados dez SNPs associados ao sexo que corroboram com o sistema de determinação genético XX/XY. Além disso, foi possível identificar os genes *znrf2b*, *nod1*, *bHLH* e *fzd* como candidatos a gene mestre determinante do sexo (MSD). Os marcadores que apresentaram maior acurácia estão localizados nos íntrons do gene *znrf2b* (AX-508832278 e CM_03_555) e no éxon do *nod1* (CM_25_632). O SNP CM_25_632 é responsável por uma variação no códon do RNAm (TGC e TGT), no entanto, trata-se de uma substituição sinônima em que as duas trincas de bases codificam um mesmo aminoácido, a cisteína. Os iniciadores desenvolvidos que têm como alvo o éxons do gene *bHLH* amplificaram o fragmento de DNA principalmente nos machos, o que indica a presença de uma região sexo-específica. O *fzd*, com um único éxon com 1629 pb no tabaqui, teve quatro pares de iniciadores desenvolvidos para esta região, e somente um deles funcionou. Isso pode ter ocorrido devido a variações presentes na região do éxon do *fzd1* à qual os primers anelam. Não foi possível sequenciar todos os éxons dos genes candidatos devido à ausência de amplificação das sequências-alvo em alguns casos. Dentre os dez marcadores associados ao sexo, nenhum apresentou acurácia de 100% para prever o sexo corretamente. A partir dos resultados obtidos, não foi possível desenvolver ensaios 100% precisos para atribuir o sexo genético do tabaqui, no entanto, descobertas relevantes foram feitas, como especificadas acima. Esses resultados indicam uma direção para pesquisas complementares que ajudem a compreender melhor os mecanismos de determinação do sexo em tabaqui.