



Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes

Applied endocrinology for fish reproduction

F.L. Almeida

Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil.

Correspondência: fernanda.almeida@embrapa.br

Resumo

Os eventos regulatórios da puberdade dos teleósteos são semelhantes dentro da classe e mesmo em comparação com outros vertebrados, entretanto existem particularidades entre as espécies que tornam os estudos de reprodução de peixes espécie-específicos. Essa especificidade se estende à prática, em que os protocolos de manipulação da reprodução de peixes nem sempre têm o mesmo efeito nas diferentes espécies, acarretando, portanto, resultados finais diferentes. Ainda, na indústria de aquicultura, o manejo hormonal com finalidade de ganhos econômicos não se limita à reprodução artificial. A manipulação do sexo é uma técnica muito utilizada quando, em espécies de interesse econômico, determinado sexo apresenta superioridade zootécnica. Nesta palestra, serão apresentados os principais hormônios envolvidos na formação e na maturação gonadal de peixes, bem como suas atividades, funções e singularidades pertinentes, buscando estender dos conhecimentos fisiológicos aos tecnológicos, na intersecção entre biologia básica e aplicada.

Palavras-chave: esteroides sexuais, puberdade, reprodução, teleósteos.

Abstract

Although the events regulating puberty in teleost are very similar inside the class, and even if compared with other vertebrates, there are particularities between the species that make studies in fish reproduction very species-specific. This specificity extends to the practical activities, where the protocols of artificial reproduction have different effects in different species. In the aquaculture industry, the administration of hormones for economic purposes goes beyond reproduction in captivity. Sex manipulation is a technique largely used in species where one gender is superior in production. In the current talk, the main hormones controlling gonadal development and maturation will be presented, as well as their activities, functions and singularities, aiming at extending the knowledge from physiology to technology, at the intersection between applied and basic science.

Keywords: *puberty, reproduction, teleost, sex steroids.*

Introdução

Os teleósteos compõem o maior grupo de vertebrados. Portanto, não é estranho que apresentem uma ampla diversidade de estratégias reprodutivas, com variedades de armazenamento e uso de energia para as atividades de reprodução, presença ou ausência de migração com fins reprodutivos, o comportamento reprodutivo, etc. A versatilidade ainda é maior quando se trata de eventos celulares, como a diferenciação sexual, o desenvolvimento gonadal, as estruturas dos gametas, o tipo de fertilização e a especificidade molecular na superfície dos ovos e espermatozoides entre as mais de 30.000 espécies de peixe. Entretanto, existe muita similaridade entre os processos básicos que se iniciam com a formação de ovários e testículos e culminam com a maturação gonadal dos peixes durante a puberdade e os mecanismos que a regulam. O eixo hipófise-hipotálamo, por exemplo, é ativado por diferentes mecanismos nas diferentes classes de teleósteos, mas suas ações e funções são as mesmas observadas nos mamíferos. Devido a essas pequenas singularidades, o ideal, em termos de maximização da produção de alevinos, é a adaptação dos protocolos de indução para cada espécie zootécnica em questão.

Diferenciação sexual

Diferenciação sexual é o nome dado ao processo que, em consequência da determinação sexual (genética ou por fatores ambientais ou ainda pela combinação de ambos), direciona a formação de gônadas masculinas ou femininas em cada indivíduo. Assim como nos mamíferos, uma gônada indiferenciada precede o desenvolvimento de ovários e testículos nos peixes. Todavia, nos teleósteos a diferenciação sexual é um processo plástico cujos eventos moleculares e celulares envolvidos variam muito entre as espécies, resultando em mediações hormonais distintas dos mamíferos e com particularidades diversas. Basicamente dois tipos de diferenciação ocorrem nos peixes bissexuados: i) diferenciação direta, quando, a partir da gônada indiferenciada



forma-se diretamente um ovário ou um testículo; ii) diferenciação indireta, quando em todos os indivíduos da espécie ocorre primeiro a formação de ovários e, mais adiante, em metade dos animais, esses ovários se diferenciam em testículos.

Independentemente do tipo de diferenciação gonadal, os esteroides sexuais são classicamente considerados os mediadores da diferenciação sexual em vertebrados não mamíferos (Nakamura, 2010), embora não sejam os responsáveis primários pela determinação sexual em si. A ação dos hormônios em tempos precisos e a manutenção de suas atividades biológicas são fundamentais para o perfeito desenvolvimento de ovários e testículos nos peixes. Justamente por isso se torna fácil em peixes direcionar propositalmente a formação do sexo desejado com a simples administração de esteroides na água ou na ração dos animais.

Na maioria das espécies de peixes estudadas até o momento, o estrógeno (E_2) é o principal hormônio envolvido na diferenciação sexual, pois dele depende a formação dos ovários nas fêmeas, enquanto os andrógenos são uma consequência da diferenciação dos testículos (Devlin e Nagahama, 2002; Ijiri et al., 2008; Guigen et al., 2010). Porém, existem espécies em que a expressão de enzimas responsáveis pela síntese de testosterona (T) ou 11-cetotestosterona (11-KT; principal andrógeno dos peixes em níveis plasmáticos e de ativação de receptores) acontece antes ou durante o período crítico de diferenciação sexual (Miura et al., 2008; Hattori et al., 2009). A diferenciação sexual de fêmeas, que geralmente ocorre antes que a dos machos, depende essencialmente da estimulação do *cyp19a1*, gene responsável pela síntese da P450 aromatase, por meio de um *feedback* positivo com o fator de transcrição *foxl-2*. Além destes, outras enzimas esteroidogênicas necessárias à síntese de estradiol são sintetizadas durante os estágios iniciais de diferenciação de ovários em tilápias (Ijiri et al., 2008). Em algumas espécies, a própria presença das células germinativas primordiais é determinante para a formação ovariana, como no paulistinha, em que a ausência dessa linhagem direciona à formação de testículos (Siegfried e Nusslein-Volhard, 2008; Siegfried, 2010), independentemente da constituição genética do indivíduo.

Na formação dos testículos, a interação das expressões do *sox-9* com o *dmrt-1* leva à supressão da síntese da P450 aromatase. Estudos *in vitro* e *in vivo* em peixes mostraram que o gene *dmrt-1* tem capacidade de se ligar diretamente à região promotora do gene *cyp19a1* (Wang et al., 2010).

As gonadotropinas também têm efeito na diferenciação sexual dos peixes e com funções espécie-específicas. Em suma, o sistema FSH/FSHR (truta arco-íris, pargo e linguado; Nozaki et al., 1993; Garcia Ayala et al., 2003; Gusman et al., 2009), cuja expressão inicia-se anteriormente à do LH/LHR, é responsável pela diferenciação ovariana. No entanto, no robalo, tanto o FSH quanto o LH são determinantes para a formação de testículos (Moles et al., 2007). No paulistinha, suspeita-se que o LH seja o responsável pela formação dos ovários (Chen e Ge, 2012).

Em certas espécies em que a determinação sexual é dependente da temperatura, recentemente foi descoberto que o cortisol, glucocorticoide relacionado a respostas ao estresse, está diretamente relacionado com a diferenciação sexual. Em temperaturas elevadas, que levam à formação de populações 100% de machos, existe um aumento dos níveis plasmáticos de cortisol, responsável pela supressão da expressão gênica da *cyp19a*, inibindo a síntese da aromatase e, portanto, a síntese de estradiol (Hattori et al., 2009; Hayashi et al., 2010). Em algumas espécies, essa síntese e liberação elevadas de cortisol são concomitantes a um efeito diferente, mas de semelhante consequência, a expressão do *11 β -hsd*, enzima responsável pela oxigenação da T em 11-KT (Fernandino et al., 2012).

Aplicações da endocrinologia na manipulação do sexo dos peixes

O uso de hormônios para a inversão sexual de peixes é utilizado quando um sexo apresenta superioridade zootécnica em relação ao outro da mesma espécie. Essa discrepância entre os gêneros é muito comum nos teleósteos e ocorre geralmente por diferença na época de incidência da puberdade de machos e fêmeas. Inúmeras são as vantagens de se criar comercialmente indivíduos do mesmo sexo, sobretudo quando um dos sexos é superior em taxa de crescimento, ganho de peso ou, então, tardio em relação à maturidade sexual, visto que puberdade significa perdas econômicas em peixes de cativeiro. Além disso, obtém-se uma melhor uniformidade dos lotes, controla-se a reprodução em cativeiro e solucionam-se os problemas relacionados com criação de espécies exóticas. Geralmente a fêmea, sexualmente mais tardia, apresenta peso e tamanho superiores ao macho, alcançando valores até 50% maiores (Imsland et al., 1997).

A inversão de sexo pode ser realizada com técnicas genéticas, manipulação da temperatura ou com hormônios. Como o assunto desta palestra é o uso de hormônios na produção comercial de peixes, somente o último será abordado.

Atualmente, mais de 60 espécies de teleósteos distribuídas em 16 famílias já foram invertidas sexualmente com o uso de esteroides (aproximadamente 16 andrógenos e 12 estrógenos); e em ao menos 35 espécies de interesse comercial tem sido usada população monosexo de fêmeas (Piferrer, 2001). Entre os estrógenos, o 17 β -estradiol representa o mais utilizado para a formação de populações de fêmeas, sendo usado na inversão de várias espécies de enguias, salmonídeos, ciclídeos, ciprinídeos, anabantídeos, poecilídeos, ictalurídeos e bagres (Pandian e Sheela, 1995; Piferrer, 2001). Além de apresentar alta eficiência na inversão sexual fenotípica de peixes, o 17 β -estradiol, por ser natural e o principal responsável pela formação fisiológica



dos ovários nas fêmeas (Guiguen et al., 2010), é o esteroide que causa menor impacto ao ambiente (Piferrer, 2001). O mesmo hormônio tem sido usado no Brasil para feminização do jundiá, por exemplo (*Rhamdia quelen*; Nunes e Amaral, 2007).

A masculinização de peixes, com o uso de andrógenos ou de inibidores de aromatase, baseia-se na repressão imediata dos genes responsáveis pela diferenciação de ovários, como *foxl-2* e *cyp19a1*, pelas células da granulosa. Consequentemente, esses eventos inibem também a expressão de genes importantes para o início da oogênese (*gdf-9*, *fshb*, *lhb*), evitando o início da meiose nessas gônadas. Ao mesmo tempo, genes exclusivos das células de Sertoli (principal célula somática do testículo) são expressos, como *sox-9* e *dmrt-1*, consolidando o desenvolvimento testicular.

É interessante notar que o efeito dos esteroides para inversão sexual de machos e fêmeas é diferente. Ao contrário da inibição gênica necessária para que as fêmeas desenvolvam testículos, quando é induzida a feminização ocorre um estímulo à expressão de *foxl-2*, que inicia um *feedback* positivo com a P450 aromatase direcionando a formação de ovários. Entretanto, os altos níveis circulantes de estrógeno não suspendem a expressão dos genes envolvidos na diferenciação sexual testicular (por exemplo, *dmrt-1* e *sox-9*; Vizziano-Cantonnet et al., 2008), embora não se formem testículos.

O período para a indução hormonal deve ser antes ou durante o processo de diferenciação sexual das gônadas. Tentativas de tratamento hormonal de ovos ou larvas muito jovens falharam na inversão sexual (Rosenstein e Hulata, 1992). Por outro lado, tratamento de indivíduos adultos não teve eficácia e, no máximo, produziu indivíduos intersexo (Piferrer, 2001). A administração do hormônio pode ser diretamente na água do tanque ou na dieta dos animais. A suplementação pela dieta, método mais eficiente, envolve a mistura e homogeneização do esteroide na ração e geralmente é feita pelo método de evaporação pelo álcool (Guerrero, 1975). Além do período de início do tratamento (espécie-específico e dependente da época de diferenciação gonadal), a dosagem do hormônio (combinação de dose e duração) também é fator fundamental para o sucesso da técnica. O grau do desenvolvimento ovariano do medaka, por exemplo, é altamente dependente da duração da exposição hormonal (Paul-Prasanth et al., 2011). Tratamentos curtos com estrógenos não favorecem a perpetuação dos resultados, e os animais geneticamente machos voltam a desenvolver testículos.

Puberdade e maturidade sexual

Embora os eventos clássicos de reprodução cruzada estejam presentes em praticamente todas as espécies de peixes, a flexibilidade das estratégias reprodutivas dos teleósteos envolve um amplo espectro de particularidades que rendem à classe uma grande variedade de biológicas reprodutivas (Breder e Rosen, 1966; Baylis, 1978; Hart, 1990; Turner, 1993). Em princípio, os peixes podem ser gonocóricos, hermafroditas sequenciais ou simultâneos, ou ainda unissexuados (espécies em que ocorre somente o sexo feminino). Para que essas estratégias tenham resultados satisfatórios durante a vida adulta do peixe, uma cascata de eventos celulares e moleculares orquestra, via hormônios esteroides e não esteroides, os processos de formação gonadal e, mais tarde, de atividade testicular ou ovariana em cada espécie de peixe. Esses hormônios exercem suas funções regendo os ciclos reprodutivos dos peixes em harmonia com os estímulos ambientais e endógenos de cada indivíduo.

A maioria dos teleósteos apresenta maturação sazonal; ou seja, fatores exógenos (ambientais), como fotoperíodo, temperatura, propriedades da água ou oferta de alimentos, são de alguma forma percebidos pelo organismo e acionam neuromodulações na atividade do eixo hipófise-hipotálamo que iniciam a primeira maturação sexual ou puberdade (figura 1). Esta estreita relação com sinais ambientais asseguram que a eclosão dos ovos e o desenvolvimento larval ocorram em época e condições favoráveis. Assim como ocorre com os mamíferos, nos peixes é o eixo hipófise-hipotálamo que rege, de forma muito sincrônica, todos os eventos endócrinos envolvidos na função gonadal dos peixes, inclusive para suprimi-la em eventual necessidade (condições desfavoráveis à reprodução). Desta forma, esse eixo media um equilíbrio constante entre as atividades do sistema reprodutivo e i) as condições ambientais e ii) as condições fisiológicas do indivíduo (Schulz e Miura, 2002).

Embora muitos estudos em peixes tenham o propósito de descobrir como se dá a percepção dos sinais do meio ambiente para o sistema nervoso central (fotorreceptores na retina estimulando a produção de melatonina pela glândula pineal; termorreceptores na derme, etc.; Maitra et al., 2012), até o momento não se sabe como ocorre essa modulação. Do mesmo modo, os sinais endógenos têm sido alvo de estudos, ainda que muito já se saiba sobre a função da leptina como mediador das funções metabólicas em peixes (Tena-Sempere, 2006) e da dopamina como inibidor. De qualquer forma, a atividade dos neurônios KiSS-1 na síntese e secreção da kisspeptina tem sido bem caracterizada nos teleósteos (Felip et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2012). E acredita-se que esse neuropeptídeo seja o sinalizador que desencadeia a ativação do eixo hipófise-hipotálamo por meio de seus receptores específicos localizados nos neurônios hipotalâmicos produtores de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas; Filby et al., 2008; Nocillado e Elizer, 2008). Em várias espécies de teleósteos, duas ou três formas dos ligantes kisspeptina e GnRH e de seus receptores (GPR54 e receptor de GnRH, respectivamente) já foram identificadas (Kah et al., 2007; Biran et al., 2008; Felip et al., 2009). Em peixes, os

neurônios que sintetizam o GnRH situam-se na porção ventral do hipotálamo e inervam diretamente a hipófise com seus axônios, cujas terminações ficam próximas às células gonadotróficas dessa glândula, conforme demonstrado na figura 1 (Dubois et al., 2002).

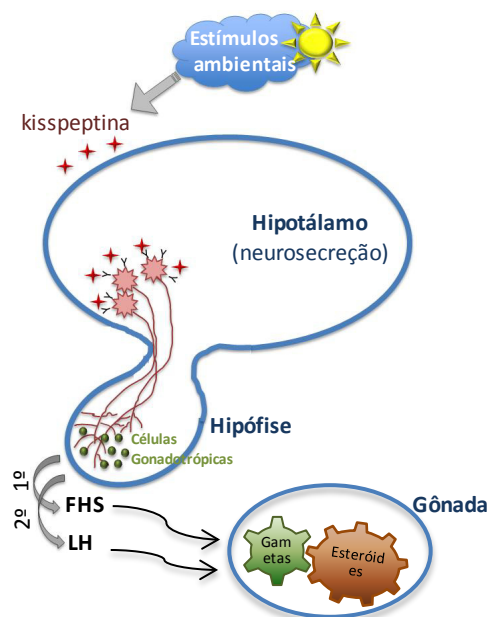


Figura 1: Desenho esquemático do eixo hipotálamo-hipofisário em peixes.

Nos mamíferos, o início da puberdade é associado a um aumento na amplitude e frequência da secreção de LH, enquanto na maioria dos peixes o sistema FSH/FSHR tem mais relevância nessa fase primordial. São poucas as espécies de teleosteos estudadas até o momento em que os níveis de LH na hipófise sejam altos no começo da puberdade (bagre africano, Schulz et al., 1997; robalo europeu, Rodriguez et al., 2000; pargo, Gen et al., 2000; e paulistinha, Chen e Ge, 2012). Assim, em geral, como resposta primária à liberação de GnRH na hipófise, as células gonadotróficas iniciam a síntese e liberação de FSH, que estimula as atividades gonadais a partir de sua ligação a seus receptores.

Nas fêmeas, o estímulo inicial e praticamente exclusivo do FSH é responsável pelo crescimento do oócito e desenvolvimento folicular. O FSH estimula a síntese de aromatase pelas células da granulosa, que convertem a testosterona produzida pelas células da teca em estradiol. O estradiol, por sua vez estimula a síntese hepática de vitelogenina, responsável pela vitelogênese ou acúmulo de vitelo nos oócitos, ocasionando o crescimento dos mesmos. Na segunda fase, conhecida por maturação final, o LH é a gonadotropina mais importante. Ele estimula as células foliculares a produzirem o progestágeno $\alpha,20\beta$ -DP em peixes, mais conhecido por hormônio indutor da maturação (MIH), que portanto, liga-se a seus receptores na superfície citoplasmática do oócito, promovendo a formação e ativação citoplasmática do fator promotor da maturação (MPF). Vários processos são, enfim, desencadeados pelo MPF, entre eles quebra da vesícula germinativa, retomada da meiose, condensação cromossômica, formação do fuso e liberação do primeiro corpúsculo polar, caracterizando a maturação final (Nagahama e Yamashita, 2008). Quando a maturação finalmente termina, ocorre a ovulação, e os oócitos são, então, liberados dos folículos. As prostaglandinas também exercem importante papel na maturação final e ovulação em muitas espécies de peixes (Lister e van der Kraak, 2008).

Nos machos, o FSH é responsável, via células de Sertoli, pela proliferação espermatogonial que representa a primeira fase da espermatogênese. Ao mesmo tempo, o FSH ativa receptores presentes nas células de Leydig (principal célula esteroideogênica do testículo) estimulando a síntese e secreção de andrógenos (Ohta et al., 2008; Garcia-Lopes et al., 2009). Nessa fase inicial, a testosterona é o principal andrógeno produzido nos testículos dos peixes, e possivelmente auxilia no apoio à fase proliferativa, porém indiretamente, prevenindo a apoptose das células germinativas durante as primeiras divisões celulares (via receptores nas próprias células de Sertoli; Almeida et al., 2009). Essa atividade esteroideogênica do FSH é uma particularidade dos peixes e se pronuncia com o avançar da meiose. Próximo à maturação final, com a espermiogênese e liberação dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos, outro andrógeno, ainda mais potente em ativação de receptores, apresenta-se em altos picos plasmáticos, a 11-cetotestosterona. Também nos machos a progesterona desempenha funções durante a maturação final, estimulando a meiose, espermiogênese e hidratação dos espermatozoides. Nessa fase de liberação de sêmen e acasalamento, o LH é a principal gonadotropina circulante



e apresenta um *feedback* positivo com a testosterona e a 11-cetotestosterona.

Após desova e encerramento das atividades reprodutivas, tanto o FSH quanto o LH e os esteroides sexuais retornam aos seus níveis basais que, em muitas espécies de peixes, significam valores quase nulos ou indetectáveis.

Aplicações da endocrinologia na reprodução de peixes

A reprodução de peixes mantidos em cativeiro pode ser controlada por meio da manipulação do ambiente, como temperatura da água, fotoperíodo ou presença de abrigos e ninhos para acasalamento e desova (Taranger et al., 2010). Porém, na maioria das espécies criadas com objetivos comerciais e principalmente as espécies reofílicas brasileiras, o uso de hormônios é obrigatório para a prática de reprodução artificial. Nas espécies reofílicas, a ausência da correnteza nos tanques de piscicultura é o principal obstáculo à reprodução. Em cultivo intensivo, algumas espécies podem não maturar sexualmente, quando não há o desenvolvimento testicular e/ou ovariano, ou apresentar dificuldades na maturação final e/ou liberação dos oócitos e espermatozoides.

Quando em condições de confinamento, os machos geralmente apresentam reduzido volume de sêmen e espermatozoides de baixa qualidade. As fêmeas na mesma situação não ovulam, ou não ocorre a maturação final dos oócitos, que ficam retidos e são reabsorvidos nos ovários. Portanto, terapias hormonais são comumente utilizadas para extinguir os problemas relacionados à espermiogênese e à produção de fluido seminal, às falhas na maturação oocitária e à ovulação.

A maioria das técnicas hormonais para indução da reprodução dos peixes baseia-se na aplicação intramuscular ou intra-abdominal dos hormônios, principalmente na base das nadadeiras peitorais. São administrados vários hormônios que atuam em diferentes níveis do eixo hipófise-hipotálamo, sendo o mais antigo e ainda o mais utilizado o extrato bruto da hipófise de peixes maduros. Atualmente se empregam também gonadotropinas purificadas parcial ou totalmente, que são industrializadas especificamente para essa finalidade (Criscuolo-Urbinati et al., 2012). Outro hormônio muito usado é o GnRH de espécies variadas, devido a sua semelhança entre os vertebrados superiores e inferiores. Da mesma forma, a busarelina, um análogo do GnRH, vem sendo utilizada na indução reprodutiva de peixes. Antagonistas da dopamina bloqueiam o mecanismo inibidor da dopamina, elevando a secreção de GnRH e induzindo a maturação. E mais recente são os hormônios sintéticos similares às gonadotropinas, que têm sido testados nas diversas espécies em busca de protocolos espécie-específicos, por apresentarem longo tempo de estocagem e agirem diretamente nas gônadas.

A maturação final e a liberação dos gametas ocorrem em poucas horas após administração do hormônio e dependem da espécie em questão. Vale ainda ressaltar que a taxa de sucesso destes hormônios (sintéticos ou naturais; simuladores das atividades do GnRH ou das gonadotropinas; etc.) varia entre as espécies de teleósteos. Adaptações em diferentes protocolos (período e dosagem) é sempre o caminho para se alcançarem resultados satisfatórios quando trabalhos de reprodução artificial em novas espécies de peixes são iniciados. No entanto, independente da espécie em questão, a indução hormonal apenas causa os efeitos desejáveis quando administrada em animais cujo desenvolvimento gonadal inicial já tenha se iniciado previamente.

Conclusão e perspectivas

Ainda há pouco conhecimento sobre o controle neuroendócrino da reprodução de peixes, agravado por i) particularidade(s) fisiológica(s) de cada espécie; ii) sensibilidade dos peixes aos fatores do meio ambiente; iii) forte dependência da fisiologia reprodutiva dos peixes com o crescimento somático e o balanço energético do indivíduo.

Com isso, inúmeros protocolos para indução da reprodução de peixes são testados constantemente e, ainda, individualmente para cada espécie, em uma busca constante pelo balanço ideal entre preço e efetividade. Mais informações são necessárias não somente sobre a fisiologia da reprodução das espécies de teleósteos, mas também sobre os aspectos práticos e as tecnologias direcionadas à produção de alevinos. Esses conhecimentos são a base para a melhora da relação custo/produzibilidade com o menor impacto ambiental possível, rendendo sustentabilidade à cadeia produtiva do pescado.

Referências

- Almeida FL, Taranger GL, Norberg B, Karlsen Ø, Bogerd J, Schulz R. Photoperiod-modulated testis maturation in Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.). Biol Reprod, v.80, p.631-640, 2009.
- Baylis JR. Paternal behavior in fishes: a question of investment, timing or rate? Nature, v.276, p.738, 1978.
- Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. Biol Reprod, v.79, p.776-786, 2008.
- Breden CM, Rosen DE. Modes of reproduction in fishes. New York: Natural History Press, 1966.
- Chen W, Ge W. Ontogenic expression profiles of gonadotropins (fshb and lhb) and growth hormone (gh) during



- sexual differentiation and puberty onset in female zebrafish. *Biol Reprod*, v.86, p.73, 2012.
- Crisuolo-Urbinati E, Kuradomi RY, Urbinati EC, Batlouni SR.** The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology*, v.78, p.2087-2094, 2012.
- Devlin RH, Nagahama Y.** Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, v.208, p.191-364, 2002.
- Dubois EA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJT.** Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Res Bull*, v.57, p.413-418, 2002.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M, Gómez A.** Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol Cell Endocrinol*, v.312, p.61-71, 2009.
- Fernandino JI, Hattori R S, Kishii A, Strüssmann CA, Somoza GM.** The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: the 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology*, v.153, p.6003-6011, 2012.
- Filby AL, van Aerle R, Duitman J, Tyler CR.** The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biol Reprod*, v.78, p.278-289, 2008.
- Garcia Ayala A, Villaplana M, Garcia Hernandez MP, Chaves Pozo E, Agulleiro B.** FSH-, LH-, and TSH-expressing cells during development of *Sparus aurata* L. (teleostei). An immunocytochemical study. *Gen. Comp. Endocrinol*, v.134, p.72-79, 2003.
- García-Lopez A, Bogerd J, Granneman JC, van Dijk W, Trant JM, Taranger GL, Schulz RW.** Leydig cells express FSH receptors in African catfish. *Endocrinology*, v.150, p.357-365, 2009.
- Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, Tanaka H, Moriyama S, Kagawa H.** Unique expression of gonadotropin - I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biol Reprod*, v.63, p.308-319, 2000.
- Guerrero RD.** Use of androgens for production of all-male tilapia-aurea (steindachner). *Trans Am Fish Soc*, v.104, p.342-348, 1975.
- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang CF.** Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol*, v.165, p.352-366, 2010.
- Guzman JM, Bayarri MJ, Ramos J, Zohar Y, Sarasquete C, Mananos EL.** Follicle stimulating hormone (LH) gene expression during larval development in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v.154, p.37-43, 2009.
- Hart NH.** Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *Int J Cytol*, v.121, p.1-66, 1990.
- Hattori RS, Fernandino JI, Kishii A, Kimura H, Kinno T, Oura M, Somoza GM, Yokota M, Strussman CA, Watanabe S.** Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLoS ONE*, v.4, p.e6548, 2009.
- Hayashi Y, Kobira H, Yagamuchi T, Shiraishi E, Yazawa T, Hirai T, Kamei Y, Kitano T.** High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.679-686, 2010.
- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y.** Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod*, v.78, p.333-341, 2008.
- Imslund AK, Folkvord A, Grung GL, Stefansson SO, Taranger GL.** Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810). *Aquac Res*, v.28, p.101-114, 1997.
- Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ.** GnRH and GnRH receptors in metazoan: A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol*, v.153, p.346-364, 2007.
- Lister AL, Van Der Kraak G.** An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. *Gen Comp Endocrinol*, v.159, p.46-57, 2008.
- Maitra SK, Chattoraj A, Mukherjee S, Moniruzzaman M.** Melatonin: A potent candidate in the regulation of fish oocyte growth and maturation. *Gen Comp Endocrinol*, 2012. doi: 10.1016/j.yggen.2012.09.015.
- Miura S, Horiguchi R, Nakamura M.** Immunohistochemical evidence for 11 beta-hydroxylase (P45011beta) and androgen production in the gonad during sex differentiation and in adults in the protandrous anemonefish *Amphiprion clarkii*. *Zool Sci*, v.25, p.212-219, 2008.
- Moles G, Carrillo M, Mananos E, Mylonas CC, Zanuy S.** Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gen Comp Endocrinol*, v.150, p.76-86, 2007.
- Nagahama Y, Yamashita M.** Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev Growth Differ*, v.50, p.195-219, 2008.
- Nakamura M.** The mechanism of sex determination in vertebrates - are sex steroids the key factor? *J Exp Zool Ecol Physiol*, v.313, p.381-398, 2010.
- Nocillado J, Elizur A.** Neuroendocrine regulation of puberty in fish. *Mol Reprod Dev*, v.75, p.355-361, 2008.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P.** Salmonid pituitary gonadotrophs. III. Chronological appearance of GTH I and



other adenohipophysial hormones in the pituitary of the developing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*). Gen Comp Endocrinol, v.92, p.233-241, 1993.

Nunes MFS, Amaral HJ. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. 2007. Monografia (Conclusão de curso) – Oceanografia, UNIVALI, Itajai, SC, 2007.

Ohta T, Miyake H, Miura C, Kamei H, Aida K, Miura T. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. Biol Reprod, v.77, p.970-977, 2007.

Pandian TJ, Sheela SG. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture, v.138, p.1-22, 1995.

Paul-Prasanth B, Shibata Y, Horiguchi R, Nagahama Y. Exposure to diethylstilbestrol during embryonic and larval stages of medaka fish (*Oryzias latipes*) leads to sex reversal in genetic males and reduced gonad weight in genetic females. Endocrinology, v.152, p.707-717, 2011.

Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, v.197, p.229-281, 2001.

Piferrer F, Ribas L, Díaz N. Genomic approaches to study genetic and environmental influences on fish sex determination and differentiation. Mar. Biotechnol, v.14, p.591-604; 2012.

Rodriguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. Fish Physiol Biochem, v.23, p.141-150, 2000.

Rosenstein S, Hulata G. Sex reversal in the genus *Oreochromis*. I. Immersion of eggs and embryos in oestrogen solutions is ineffective. Aquacult Fish Manag, v.23, p.669-678, 1992.

Schulz RW, Zandbergen MA, Peute J, Bogerd J, van Dijk W, Goos HJ. Pituitary gonadotrophs are strongly activated at the beginning of spermatogenesis in African catfish, *clarias gariepinus*. Biol Reprod, v.57, p.139-147, 1997.

Schulz RW, Miura T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiol Biochem, v.26, p.43-56, 2002.

Siegfried KR. In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. J Fish Biol, v.76, p.1879-1902, 2010.

Siegfried KR, Nusslein-Volhard C. Germ line control of female sex determination in zebrafish. Dev Biol, v.324, p.277-287, 2008.

Taranger GL, Carrillo M, Schulz RW, Fontaine P, Zanuy S, Felip A, Weltzien FA, Dufour S, Karlsen O, Andersson E, Hansen T. Control of puberty in farmed fish. Gen Comp Endocrinol, v.165, p.483-515, 2010.

Tena-Sempere M. GPR54 and kisspeptin in reproduction. Hum Reprod Update, v.12, p.631-639, 2006.

Tena-Sempere M, Felip A, Gómez A, Zanuy S, Carrillo M. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. Gen Comp Endocrinol, v.175, p.234-243, 2012.

Turner G. Teleost mating behavior. In: Pitcher TJ. (Ed.). Behaviour of teleost fishes. 2. Ed. Londres: Chapman and Hall, 1993. p.307-331.

Vizziano-Cantonnet D, Baron D, Mahe S, Cauty C, Fostier A, Guiguen Y. Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. J Mol Endocrinol, v.41, p.277-288, 2008.

Wang DS, Zhou LY, Kobayashi T, Matsuda M, Shibata Y, Sakai F, Nagahama Y. Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. Endocrinology, v.151, p.1331-1340, 2010.