

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**Diferenciação sexual, estrutura populacional e ciclo reprodutivo de piracanjubas (*Brycon orbignyana*) sob condições de cultivo**

ÉVERTON LUÍS ZARDO  
Zootecnista/UFSM  
Mestre em Biodiversidade Animal/UFSM

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Zootecnia – Área de concentração: Produção Animal.

Porto Alegre, RS, Brasil  
Março de 2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Zardo, Éverton Luís

Diferenciação sexual, estrutura populacional e ciclo reprodutivo de piracanjubas (*Brycon orbignyanus*) sob condições de cultivo. / Éverton Luís Zardo. -- 2018.

118 f.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr..

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. espermatogênese. 2. diferenciação gonadal. 3. morfogênese gonadal. 4. razão sexual. 5. relação peso-comprimento. I. Streit Jr., Danilo Pedro, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Everton Luis Zardo  
Mestre em Biodiversidade Animal

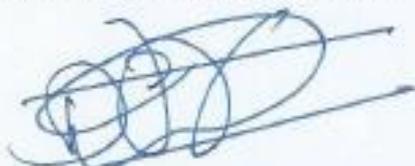
## TESE

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### DOUTOR EM ZOOTECNIA

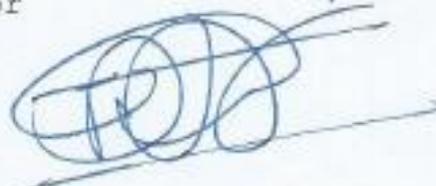
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 23.03.2018  
Pela Banca Examinadora



DANILO PEDRO STREIT JR  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientador

Homologado em: 02/05/2018  
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia

*Clarisse Bernhardt Fialho*  
Clarisse Bernhardt Fialho  
UFRGS

*Biógenes Antônio de Siqueira-Silva*  
Biógenes Antônio de Siqueira-Silva  
UNIFESP

*Rodolfo Nardoz Sirol*  
Rodolfo Nardoz Sirol  
CPFL Energia

*Luis André Nassr de Sampa*  
Luis André Nassr de Sampa  
FURG

*Carlos Alberto Bissani*  
CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de Agronomia

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me conceder o dom da vida, saúde e perseverança para alcançar meus objetivos.

À minha família, minha mãe Mércia, meu pai Leonir e minha irmã Daniela por sempre estarem do meu lado e me ensinarem o verdadeiro valor da família e os valores morais que levo até hoje e sempre levarei. Vocês são a base de tudo! À minha namorada Marciele pelo amor, carinho, apoio e compreensão ao longo desta caminhada. Apesar de alguns momentos de distância ou dificuldade, sempre caminhamos juntos e sempre pude contar contigo!

Ao meu orientador Danilo Pedro Streit Jr. Pela confiança depositada em meu trabalho. Obrigado pela oportunidade, incentivo, ensinamentos e parceria ao longo destes anos.

Aos colegas do AQUAM pelas conversas, discussões e auxílio no desenvolvimento das atividades. Aprendi e cresci muito com vocês e tenho certeza que levarei cada um para o resto da vida.

Às professoras Clarcie e Júlia por me auxiliarem na realização das análises histológicas e abrirem espaço para que eu pudesse utilizar a estrutura do laboratório de Ictiologia/UFRGS. Ao Dr. Juan Esquivel por abrir as portas da piscicultura Panamá e permitir a realização das coletas.

Aos meus familiares, que apesar do pouco tempo de convívio nos últimos anos, sempre me receberam de braços abertos com boas conversas e risadas. Agradeço também aos meus sogros Norberto e Marlene e meus cunhados Gabriel e Miguela por sempre me receberem bem suas casas e proporcionar momentos de alegria e descontração.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de pesquisa e ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da UFRGS pela oportunidade de realização desta e demais pesquisas.

À Energética Barra Grande S.A e Campos Novos Energia S.A. pelo financiamento ao projeto P&D "Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): indicador para programas ambientais de empresas de energia elétrica", ao qual faz parte esta pesquisa.

Enfim, aos amigos que próximos ou distantes de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho e estiveram presentes em algum momento desta difícil caminhada.

## DIFERENCIAÇÃO SEXUAL, ESTRUTURA POPULACIONAL E CICLO REPRODUTIVO DE PIRACANJUBAS (*BRYCON ORBIGNYANUS*) SOB CONDIÇÕES DE CULTIVO

Autor: Éverton Luís Zardo

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

**RESUMO:** A espécie em estudo (*Brycon orbignyanus*) vem apresentando um declínio populacional importante nos últimos anos em função de interferências antrópicas. Por este motivo, populações naturais na bacia do rio Uruguai são praticamente inexistentes, e os estoques mantidos em cativeiro apresentam razões sexuais desproporcionais e perdas importantes de variabilidade genética, o que prejudica o uso desta espécie em programas de conservação. Esta tese tem como objetivo principal avaliar parâmetros populacionais e reprodutivos de *Brycon orbignyanus* sob condições de cativeiro visando a aplicabilidade deste conhecimento em programas de conservação. Com isso, objetivou-se no primeiro experimento avaliar as flutuações na razão sexual ao longo do desenvolvimento ontogenético e os diferentes padrões morfológicos de crescimento entre os sexos. Quinhentos exemplares foram amostrados de uma piscicultura comercial e os dados biométricos foram registrados para a realização de uma regressão linear entre peso e comprimento. A partir do teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) foi possível observar que a razão sexual apresentou desproporções nas classes de comprimento superiores. Os machos e fêmeas apresentaram crescimento alométrico positivo ( $b=3,35$  e  $b=3,44$ ), enquanto indivíduos sexualmente indiferenciados apresentaram alometria negativa ( $b=2,96$ ). O objetivo do segundo estudo foi descrever os processos de diferenciação sexual, a fim de definir o período termossensível. Após eutanásia dos animais, as gônadas foram coletadas e fixadas em solução formaldeído tamponado 4%. Os cortes seriados (3 $\mu$ m) foram corados com Azul de Toluidina e analisados por microscopia de luz. Os primeiros sinais de diferenciação sexual foram observados apenas aos 323 dias após a fertilização (DAF) e, aos 730 DAF todos os indivíduos já estavam diferenciados sexualmente. O objetivo do terceiro estudo foi descrever o ciclo reprodutivo de machos de *B. orbignyanus*, a fim de se estabelecer uma escala de maturação para machos desta espécie. Para isto, exemplares da espécie foram coletados periodicamente em uma estação de piscicultura comercial. Assim como no experimento anterior, as gônadas foram coletadas e fixadas para análise histológica. As análises das imagens foram obtidas através de microscópio óptico e a descrição das fases reprodutivas seguiu recomendações de Brown-Peterson et al. (2011). Foram estabelecidas 5 fases reprodutivas de acordo com as características macroscópicas dos testículos, presença e distribuição das células espermatogênicas e variações no índice gonadossomático. Os primeiros indivíduos aptos à reprodução foram observados aos 435 DAF.

**PALAVRAS-CHAVE:** espermatogênese, diferenciação gonadal, morfogênese gonadal, razão sexual, relação peso-comprimento.

---

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (126 p.) Março, 2018.

## DIFFERENTIATION, POPULATION STRUCTURE AND REPRODUCTIVE CYCLE OF PIRACANJUBAS (*BRYCON ORBIGNYANUS*) UNDER CULTIVATION CONDITIONS

Author: Éverton Luís Zardo

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

**ABSTRACT:** The species under study (*Brycon orbignyanus*) has undergone a important population decline in the last years due to anthropic interferences. For this reason, natural populations in the Uruguay River basin are practically non-existent, and stocks kept in captivity suffer from disproportionate sex ratios, and significant losses of genetic variability, impairing the use of this species in conservation programs. The main objective of this thesis is to evaluate the population and reproductive parameters of *Brycon orbignyanus* under captive conditions aiming the applicability of this knowledge in conservation programs. Thus, the objective of the first experiment was to evaluate the fluctuations in sexual ratio along the ontogenetic development and the different morphological patterns of growth between the sexes. Five hundred specimens were sampled from commercial fish farming and biometric data were recorded for a linear regression between weight and length. From the chi-square test ( $\chi^2$ ) it was possible to observe that the sex ratio showed disproportions in the upper length classes. Males and females showed positive allometric growth ( $b = 3.35$  and  $b = 3.44$ ), while sexually undifferentiated individuals showed negative allometry ( $b = 2.96$ ). The objective of the second experiment was describe the processes of sexual differentiation, in order to define the thermosensitive period. After euthanasia of the animals, the gonads were collected and fixed in 4% buffered formaldehyde solution. Serial sections (3  $\mu\text{m}$ ) were stained with Toluidine Blue and analyzed by light microscopy. The first signs of sexual differentiation were observed only at 323 days after fertilization (DAF), and at 730 DAF all individuals were already sexually differentiated. The objective of the third experiment was to describe the reproductive cycle of *B. orbignyanus* males, in order to establish a maturation scale for males of this species. For this, specimens were collected periodically in a commercial fish farm. As in the previous experiment, the gonads were collected and fixed for histological analysis. The images were obtained through an optical microscope and analyzed according to the description of the reproductive phases suggested by Brown-Peterson et al. (2011). Five reproductive phases were established according to macroscopic characteristics of the testes, presence and distribution of spermatogenic cells and variations in the gonadosomatic index. The first individuals able to reproduce were observed at 435 DAF.

**KEYWORDS:** reproductive cycle, sexual differentiation, gonadal morphogenesis, sexual ratio, weight-length relation.

---

<sup>1</sup>Doctoral thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (126 p.) March, 2018.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| <b>RELAÇÃO DE TABELAS</b> .....  | 8   |
| <b>RELAÇÃO DE FIGURAS</b> .....  | 9   |
| <b>RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....  | 13  |
| <b>CAPÍTULO I</b> .....  | 14  |
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 15  |
| <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | 17  |
| <i>Brycon orbignyanus</i> .....  | 17  |
| <i>Brycon orbignyanus</i> como indicador ambiental.....  | 18  |
| Estratégias para a conservação de <i>B. orbignyanus</i> .....  | 19  |
| Reprodução em peixes .....   | 21  |
| Proporção sexual e mecanismos de determinação e diferenciação sexual em peixes.....  | 22  |
| Fatores ambientais na determinação e diferenciação sexual .....  | 23  |
| Determinação sexual por temperatura .....  | 24  |
| Desenvolvimento gonadal e gametogênese .....   | 26  |
| Ciclo reprodutivo .....  | 29  |
| <b>HIPÓTESES</b> .....   | 34  |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 35  |
| Geral .....  | 35  |
| Específicos.....   | 35  |
| <b>CAPÍTULO II: Artigo “Razão sexual, relação peso-comprimento e fator de condição em piracanjubas cultivadas”</b> .....             | 36  |
| <b>CAPÍTULO III: Artigo “Diferenciação sexual em piracanjubas <i>Brycon orbignyanus</i> cultivadas”</b> .....                        | 58  |
| <b>CAPÍTULO IV: Artigo “Espermatogênese e ciclo reprodutivo de machos de <i>Brycon orbignyanus</i> em condições de cultivo</b> ..... | 84  |
| <b>CAPÍTULO V</b> .....  | 107 |
| <b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....  | 108 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 109 |
| <b>APÊNDICES</b> .....   | 117 |
| <b>VITA</b> .....  | 118 |

## RELAÇÃO DE TABELAS

### CAPÍTULO I:

**Tabela 1.** Características macro e microscópicas das fases presentes dentro do ciclo reprodutivo de fêmeas. O tempo de cada fase é espécie-dependente e alguns critérios podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva ou temperatura da água..... 31

**Tabela 2.** Características macro e microscópicas das fases presentes dentro do ciclo reprodutivo de machos. O tempo de cada fase é espécie-dependente e alguns critérios podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva ou temperatura da água..... 32

### CAPÍTULO II:

**Tabela 1.** Dados biométricos dos indivíduos de *Brycon orbignyana* coletados. N = número amostral; CT = comprimento total médio (cm); PT = peso total médio (g)..... 42

**Tabela 2.** Dados biométricos e razão sexual de piracanjubas (*Brycon orbignyana*) nas diferentes classes de comprimento mantidas em cativeiro.. 46

### CAPÍTULO III:

**Tabela I.** Temperaturas médias registradas ao longo do período de coletas de *Brycon orbignyana*. ..... 65

**Tabela II.** Dados biométricos de *Brycon orbignyana* com diferentes padrões morfológicos. GI=gônada indiferenciada; DO=diferenciação ovariana; DT=diferenciação testicular..... 66

### CAPÍTULO IV:

**Tabela 1.** Dados biométricos de *Brycon orbignyana* em condições de cultivo nas diferentes fases reprodutivas. CT = comprimento total (cm); Mín.: mínimo; Máx.: máximo; PT = peso total (g). ..... 89

**Tabela 2.** Características morfológicas das células espermatogênicas encontradas em *Brycon orbignyana* mantidos em condições de cultivo. .... 90

## RELAÇÃO DE FIGURAS

### CAPÍTULO I:

- Figura 1.** Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Fonte: Acervo pessoal..... 18
- Figura 2.** Estratégias para a conservação de *Brycon orbignyanus*. Fonte: Adaptado de Lopera-Barrero, 2009..... 20
- Figura 3.** Critérios utilizados para verificar a presença de determinação sexual por temperatura (TSD), genética (GSD), ou a combinação de ambas (GSD+TE). GSD\*=genetic sex determination; TE\*=effects of temperature; TSD\*=temperature sex determination; RTD\*=range of temperature during development period. \*Siglas referentes aos termos em inglês para facilitar a leitura e comparação com demais artigos publicados na área. .... 25

### CAPÍTULO II:

- Figura 2.** Identificação sexual realizada a partir de microscopia de luz em *Brycon orbignyanus* mantidas em condições semi-intensivas de cultivo. Exemplar macho. Notar a presença de espermatogônia (Eg), espermatócito primário (Et1), espermatócito secundário (Et2), espermatíde (Ed), espermatozoide (Ez) e vasos sanguíneos (VS). Coloração: Azul de Toluidina.44
- Figura 3.** Identificação sexual realizada a partir de microscopia de luz em *Brycon orbignyanus* mantidas em condições semi-intensivas de cultivo. Exemplar fêmea. Notar a presença de oogônia (Og), oócito em crescimento primário (OCP), folículo ovariano (FO), túnica albugínea (TA), lamelas ovíferas (LO) e espaços interlamelares (EI). Coloração: Azul de Toluidina..... 45
- Figura 4.** Regressão linear logarítma e relação peso-comprimento de juvenis de *Brycon orbignyanus* indiferenciados mantidos em condições semi-intensivas de cultivo. LnPT = Logaritmo natural de peso; LnCT = logaritmo natural de comprimento; N = número amostral; PT = peso total; CT = comprimento total; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação. .... 47
- Figura 5.** Regressão linear logarítma, relação peso-comprimento e sobreposição de retas em *Brycon orbignyanus* machos e fêmeas mantidos em condições semi-intensivas de cultivo. LnPT = Logaritmo natural de peso; LnCT = logaritmo natural de comprimento; N = número amostral; PT = peso total; CT = comprimento total; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação. .... 48
- Figura 6.** Alterações no fator de condição e coeficiente de alometria em *Brycon orbignyanus* indiferenciados, machos e fêmeas mantidas em condições semi-intensivas de cultivo. .... 49
- Figura 7.** Medianas e desvios interquartílicos para o fator de condição verificadas ao longo das estações do ano em *Brycon orbignyanus* mantidas em condições semi-intensivas de cultivo. .... 50

### CAPÍTULO III:

**Figura 1.** Frequência relativa dos padrões morfológicos das gônadas de *Brycon orbignyanus* em relação aos dias após a fertilização (DAF). GI = gônada indiferenciada; DO = diferenciação ovariana; DT = diferenciação testicular. ... 67

**Figura 2.** Frequência relativa dos padrões morfológicos das gônadas de *Brycon orbignyanus* em relação às classes de comprimento total. GI = gônada indiferenciada; DO = diferenciação ovariana; DT = diferenciação testicular. ... 67

**Figura 3.** Fotomicrografia da gônada indiferenciada de *Brycon orbignyanus*. A-B) Células germinativas primordiais envoltas por células somáticas. C) Formação dos cordões contínuos de células germinativas primordiais. D) Formato ovalado e núcleo volumoso das células germinativas primordiais. CGP=células germinativas primordiais; CS=células somáticas; VS=vasos sanguíneos; seta fechada=grânulos; cabeça de seta=cordões contínuos. Coloração: Azul de Toluidina. .... 69

**Figura 4.** Fotomicrografia da diferenciação ovariana em *Brycon orbignyanus*. A) Formação dos cistos de oogônias. B) Formação de cistos de oogônias isoladas por células somáticas. Og=oogônia; CS=célula somática; seta fechada=grânulos elétron-densos correspondentes às núages. Coloração: Azul de Toluidina..... 70

**Figura 5.** Fotomicrografia da diferenciação ovariana em *Brycon orbignyanus*. A-B) Formação dos primeiros oócitos em crescimento primário e presença de oócitos profásicos iniciais. C) Formação do folículo ovariano, composto por oócitos agora em crescimento primário e células foliculares ao seu redor. D) Oócitos em crescimento primário perinucleares. Og=oogônia; Op=oócito profásico; CS=célula somática; OCP=oócito em crescimento primário; Fo=folículo ovariano. Po=projeções ovarianas. Coloração: Azul de Toluidina. .... 71

**Figura 6.** Fotomicrografia da diferenciação testicular em *Brycon orbignyanus*. A-B) Células somáticas (pré-Sertoli) invadindo e isolando gradativamente as espermatogônias. Detalhe do formato arredondado, núcleo evidente e um único nucléolo das espermatogônias, com a presença de granulações associadas às núages no citoplasma e projeções citoplasmáticas das células somáticas (pré-Sertoli) interpondo-se às espermatogônias. Eg=espermatogônia; CS=célula somática; Et=espermatócito; VS=vaso sanguíneo; seta fechada=granulações; cabeça de seta=projeções citoplasmáticas das células somáticas. Coloração: Azul de Toluidina..... 73

**Figura 7.** Fotomicrografia da diferenciação testicular em *Brycon orbignyanus*. A-B) Cistos formados e compostos por uma grande quantidade de espermatogônias e espermatogênese ativa. Notar os espaços entre os cistos, formando o compartimento luminal e a presença de vasos sanguíneos próximos ao compartimento germinativo. Eg=espermatogônia; CS=célula somática; VS=vaso sanguíneo; Eg=espermatogônia; Et1=espermatócito primário;

Et2=espermátocito secundário; Ed=espermátide; Ez=espermatozoide; Seta fechada=compartimento luminal. Coloração: Azul de Toluidina..... 74

#### CAPÍTULO IV:

**Figura 1.** Distribuição percentual sazonal das 5 fases reprodutivas observadas em *Brycon orbignyanus* em condições de cultivo. .... 91

**Figura 2.** Distribuição percentual das fases reprodutivas em relação às idades em dias após a fertilização (DAF) de *Brycon orbignyanus* sob condições de cativeiro..... 91

**Figura 3.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase de maturação “imaturado” de *Brycon orbignyanus*. A) Presença de cistos de espermatogônias secundárias e vasos sanguíneos. B) Espermatogônias primárias isoladas ao longo do tecido, delimitadas por extensões citoplasmáticas das células somáticas (Sertoli). As espermatogônias secundárias apresentam-se em cistos delimitadas pelas células de Sertoli. Eg1=espermatogônia primária; Eg2=espermatogônia secundária; CS=célula somática; VS=vaso sanguíneo; flecha=cistos de espermatogônias. Coloração: Azul de Toluidina. Escala:1:273 e 1:65µm. .... 92

**Figura 4.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase de maturação “desenvolvimento inicial” de *Brycon orbignyanus*. A-B) Cistos com poucos espermátocitos primários e espermatogônias primárias e secundárias. Em B, notar a presença de espermátocitos primários delimitados por processos citoplasmáticos das células de Sertoli. Eg1 = espermatogônia primária; Eg2 = espermatogônia secundária; Et1 = espermátocito primário. CSe = célula de Sertoli. Coloração: Azul de Toluidina. Escala:1:273 e 1:65µm..... 93

**Figura 5.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase de maturação “desenvolvimento” de *Brycon orbignyanus*. A-B) Cistos de células germinativas em todos os estágios de desenvolvimento e lúmen completamente formado porém desprovido de espermatozoides. Eg1 = espermatogônia primária; Eg2 = espermatogônia secundária; Et1 = espermátocito primário; Et2 = espermátocito secundário; Ed = espermátide; Ez = espermatozoide; Lu = lúmen. Coloração: Azul de Toluidina..... 94

**Figura 6.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase “apto à liberar esperma” de *Brycon orbignyanus*. A-B) Cistos contendo todas as linhagens espermatogênicas e epitélio germinativo descontínuo ao longo do lúmen dos túbulos seminíferos. C) Presença de cistos de espermátocitos primários, secundários, espermátide e a liberação de espermatozoides para o espaço luminal. D) Espermatogônias primárias isoladas e espermatogênese ativa. Eg1 = espermatogônia primária; Eg2 = espermatogônia secundária; Et1 = espermátocito primário; Et2 = espermátocito secundário; Ed = espermátide; Ez = espermatozoide; Lu = lúmen; VS = vaso sanguíneo; flecha = epitélio

germinativo descontínuo; cabeça de seta = liberação de espermatozoides para o lúmen. Coloração: Azul de Toluidina..... 95

**Figura 7.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase “regressão” de *Brycon orbignyanus*. A-B) Espermatozóides residuais no lúmen e epitélio germinativo descontínuo. Presença de estágios espermatócitos primários, secundários e espermátides. Et1 = espermatócito primário; Et2 = espermatócito secundário; Ed = espermátide; Ez = espermatozoide; Lu = lúmen; flecha = epitélio germinativo descontínuo. Coloração: Azul de Toluidina..... 96

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CGP – Células Germinativas Primordiais  
CS – Célula Somática  
DAF – Dias após a fertilização  
DO – Diferenciação Ovariana  
DT – Diferenciação Testicular  
Ed – Espermátide  
Eg1 – Espermatogônia Primária  
Eg2 – Espermatogônia Secundária  
EI – Espaços Interlamelares  
ESD – Environmental Sex Determination  
Et1 – Espermatócito Primário  
Et2 – Espermatócito Secundário  
Ez – Espermatozoide  
FO – Folículo Ovariano  
GI – Gônada Indiferenciada  
GSD – Genetic Sex Determination  
Lo – Lamelas Ovíferas  
Lu – Lúmen  
N – Núcleo  
Nu – Nucléolo  
OCP – Oócito Em Crescimento Primário  
Og – Oogônia  
Op – Oócito Profásico  
RTD – Range Of Temperature During Development Period  
TE – Temperature Effects  
TSD – Temperature Sex Determination  
VS – Vaso Sanguíneo  
 $\mu\text{m}$  – Micrômetro

## **CAPÍTULO I**

## INTRODUÇÃO

A Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Valenciennes, 1850) é uma espécie reofílica pertencente à família Bryconidae (Eschmeyer & Fong, 2017), com ocorrência natural nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Lima, 2003). Esta espécie apresenta alto valor comercial em função da excelente qualidade de sua carne, boa adaptação à ambientes de cultivo e elevado potencial para a pesca esportiva (Zaniboni-Filho et al., 2006). Suas populações naturais vêm apresentando um declínio drástico nos últimos anos em função das constantes alterações ambientais causadas por ações humanas, incluindo a redução de fontes de alimento natural, pesca predatória, contaminação da água, introdução de espécies exóticas, desmatamento, expansão urbana mal planejada, construção de empreendimentos hidrelétricos, entre outros (Paiva, 1982; Agostinho et al., 2005; Lopera-Barrero, 2009). Estes fatores, aliados a alta sensibilidade da espécie à ambientes alterados, fazem com que a piracanjuba figure atualmente entre as espécies ameaçadas de extinção a nível nacional e considerada “criticamente em perigo” no Rio Grande do Sul (Machado et al., 2008). Na bacia do rio Uruguai, os registros de capturas são raros e restritos à trechos do rio Uruguai próximos ao Parque Estadual do Turvo (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003). Recentemente, apenas dois indivíduos foram capturados no rio Uruguai e seus tributários, os quais foram transferidos para a Estação de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo preservados como parte do estoque de reprodutores (Oliveira et al., 2017).

Considerando o grau de impacto sobre esta espécie na bacia do rio Uruguai, uma série de propostas e recomendações para a conservação da piracanjuba são elencadas (Carolsfeld et al., 2003; Zaniboni-Filho & Schulz, 2003; Lopera-Barrero, 2009). Entre elas, recomendações para estudos sobre os padrões de distribuição de ovos e larvas, a fim de se determinar áreas de desova; estudos com telemetria a fim de determinar os padrões de dispersão ao longo do rio e estudos relacionados ao ciclo reprodutivo e ocupação de habitats ao longo do desenvolvimento ontogenético. Além destas, destacam-se as recomendações para estudos relacionados a formação de bancos genéticos *in vivo* e *in vitro* e o desenvolvimento de tecnologias para o cultivo e programas de repovoamento em áreas críticas (Lopera-Barrero, 2009). Estas últimas estratégias se destacam em função da praticamente inexistência de registros de captura da espécie em ambiente natural ao longo da bacia do rio Uruguai, o que inviabiliza estudos conduzidos *in situ* e reforça a necessidade de estudos fora do ambiente natural (*ex situ*) para a então elaboração de planos de conservação.

Atualmente, o repovoamento é uma medida de mitigação de impacto à ictiofauna bastante utilizada, e apesar de ser aplicado no Brasil há mais de três décadas, muitas vezes não conta com respaldo científico adequado, o que pode invalidar os esforços (Agostinho et al., 2005). Um programa ideal de repovoamento deve permitir a sobrevivência e o estabelecimento da população reintroduzida, sendo necessária a adequação do manejo reprodutivo para que se evite principalmente a perda da variabilidade genética da população natural, sendo este um dos principais problemas relacionados à reintrodução de espécies nativas (Povh et al., 2008; Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Panarari-Antunes et al., 2011). Outros critérios muito importantes relacionados à

reintrodução de espécies muitas vezes são negligenciados, como local e época de soltura, tamanho dos alevinos a serem reintroduzidos, relação presa/predador presente no ambiente, razão sexual, entre outros. Dentre estes critérios, a razão sexual entre machos e fêmeas em uma população figura entre os mais importantes, uma vez que é um parâmetro ecológico básico e tem influência direta na estrutura populacional, potencial reprodutivo e portanto, na sobrevivência e propagação da espécie (Hardy, 2002; Piferrer, 2009). Em cativeiro, tem se observado empiricamente relações sexuais desproporcionais entre os sexos de piracanjuba, o que configura um problema quando estes indivíduos são utilizados em programas de repovoamento. Desta forma, há a necessidade de um maior entendimento a respeito dos **mecanismos de determinação e diferenciação sexual, biologia reprodutiva e aspectos morfológicos/morfométricos relacionados ao crescimento diferenciado em machos e fêmeas** para futura elaboração de estratégias de manejo que visem a manipulação sexual de larvas e juvenis em cativeiro.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### ***Brycon orbignyanus***

A ordem Characiformes contém aproximadamente 2000 espécies distribuídas em 23 famílias, sendo 19 exclusivamente neotropicais (Oliveira et al., 2011; Eschmeyer & Fong, 2017). Apesar de sua taxonomia ainda pouco esclarecida, a família Bryconidae, a qual está incluída dentro da ordem Characiformes, possui 89 espécies disponíveis e 50 espécies válidas, distribuídas em duas subfamílias, Salminae e Bryconinae. O gênero *Brycon* está incluído dentro da subfamília Bryconinae, a qual é composta por 78 espécies disponíveis e 46 válidas (Eschmeyer & Fong, 2017), sendo considerado um dos gêneros mais numerosos com 42 espécies descritas. Espécies do gênero *Brycon* se distribuem desde o sul do México até o Panamá, ao longo das bacias hidrográficas da América do Sul trans-Andina, nas principais bacias hidrográficas da América do Sul cis-Andina e na maioria dos sistemas costeiros do Caribe e Atlântico (Lima, 2003; Abe et al., 2014). São espécies consideradas de médio a grande porte, podendo atingir mais de 70 cm e com grande importância na América Central e do Sul principalmente como fonte de alimento (Lima, 2003).

A piracanjuba ou bracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Figura 1), distribui-se ao longo da bacia do rio da Prata, nas bacias do rio Paraguai, Paraná e Uruguai (Lima, 2003), onde por muitos anos figurou entre as espécies com maior importância comercial em registros de pesca (Carolsfeld et al., 2003), com exemplares registrados na natureza atingindo tamanho máximo de 79,5 cm e 6,0 Kg (Godoy, 1975). Apresenta o corpo fusiforme e comprimido com a boca ampla e terminal, com três séries de dentes multicuspidados no pré-maxilar e duas no dentário. Possui o corpo prateado, dorso castanho escuro com uma mancha negra na base do pedúnculo caudal estendendo-se até os raios caudais medianos. A nadadeira caudal é avermelhada com uma faixa mediana escura (Britto et al., 2003; Vaz et al., 2000). Assim como a maioria das espécies do gênero, apresenta hábito alimentar onívoro, porém com alterações ao longo do desenvolvimento ontogenético, com preferência por alimentos de origem animal e zooplâncton nas fases larvais e frutas e sementes nas fases juvenil e adulta (Cavalcanti, 1998; Meurer, 1999; Vaz et al., 2000; Garcia-Careño et al., 2002; Zaniboni-Filho & Schulz, 2003). Na natureza, a piracanjuba realiza grandes migrações reprodutivas durante os meses de novembro a fevereiro, período que coincide com os maiores índices pluviométricos, temperaturas elevadas e maior disponibilidade de alimento, o que permite uma maior sobrevivência das proles. Esta estratégia de migração entre os locais de alimentação e reprodução, além de estar relacionada com os processos fisiológicos da maturação final dos gametas, permite maximizar a utilização do ecossistema, pois assim a espécie busca os melhores locais para cada etapa de seu desenvolvimento (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003). Apresenta desova total e sazonal, primeira maturação tardia, alta fecundidade, ovos pequenos, baixo investimento parental e desenvolvimento oocitário sincrônico por grupos, com desova justamente no período de cheias após a migração (Winemiller, 1989; Vazzoler & Menezes, 1992).



FIGURA 1. Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Fonte: Acervo pessoal.

### ***Brycon orbignyanus* como indicador ambiental**

Mais de 15% da fauna de peixes neotropicais é composta por espécies migradoras, as quais apresentam ampla variedade de hábitos alimentares, estratégias reprodutivas e ocupação de habitats (Carolsfeld et al., 2003). Dentre estas espécies, a maioria pertence às ordens Siluriformes e Characiformes, com as duas juntas somando mais de 4 mil espécies de água doce, sendo geralmente considerados os maiores peixes das bacias em que se encontram e muitas vezes topos de cadeia (Nelson, 2006). Em função disto, muitas destas espécies apresentam alto valor comercial, tanto pelo potencial para o cultivo, quanto pelo apelo para a pesca esportiva, fazendo com que a pressão de pesca exerça enorme impacto nestas populações naturais (Agostinho et al., 2002). Além da pesca, outros fatores atuam de forma impactante nas populações naturais de peixes migradores, entre eles o desmatamento, a poluição dos corpos d'água, a introdução de espécies exóticas, a fragmentação de habitats e demais alterações ambientais como o represamento para a construção de empreendimentos hidrelétricos, os quais constituem a interferência antrópica de maior impacto sobre os ecossistemas fluviais. Para grandes migradores, os efeitos deletérios mais notórios causados por esta ação são a criação de uma barreira intransponível à sua migração e o ritmo irregular do fluxo de água à jusante em função da regulação de acordo com a demanda energética (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003; Agostinho et al., 2007; Rosa & Lima, 2008).

No caso da piracanjuba, espécie migradora de longas distâncias, os fatores inicialmente apontados como causas do declínio populacional estão relacionados à enorme dependência de itens alóctones na dieta, como sementes, frutos e insetos e a poluição (Ihering, 1929; Godoy, 1975). Na bacia do rio Uruguai, o desmatamento da mata ciliar principalmente em função da expansão agrícola e urbana mal planejadas contribuiu para a diminuição do

alimento natural da espécie (Espinach-Ros & Rios, 1997). Apesar destes fatores acima citados serem considerados os primeiros a atuar no declínio populacional das populações naturais da espécie, atualmente a construção de barragens para empreendimentos hidrelétricos atua de forma altamente impactante sobre estas populações, uma vez que se trata de uma importante matriz energética utilizada no país e vem sendo cada vez mais utilizada pela crescente demanda de energia. Segundo Agostinho et al. (2007), o rio Uruguai apresenta enorme potencial hidrelétrico principalmente em função de seu relevo, possuindo atualmente 16 reservatórios para este fim, alagando uma área total de aproximadamente 400 Km<sup>2</sup>.

*Brycon Orbignyanus* é uma espécie altamente sensível a mudanças na dinâmica da água, tanto por seu comportamento migratório como por sua preferência alimentar. Por ser uma espécie em alto risco de extinção, pode ser catalogado como espécie indicadora, já que um aumento das populações nos rios onde se encontra é indicativo do bom estado de conservação do ecossistema ou do sucesso dos programas de repovoamento, demonstrado pela sobrevivência e adaptação dos indivíduos ao ambiente. Por outro lado, o não estabelecimento desta espécie como residente de ciclo completo e o impacto negativo no ecossistema integrado são considerados um fracasso do programa ambiental (Lopera-Barrero, 2009).

Espécies indicadoras ou indicadores ecológicos podem ser definidos como parâmetros biológicos, baseados em populações, conjunto de populações ou propriedades sistêmicas, que por suas características qualitativas e/ou quantitativas, retratam o estado de um sistema ecológico, permitindo detectar e monitorar eventuais mudanças nesse sistema ao longo do tempo (Dale & Beyeler, 2001). Frequentemente, seu desenvolvimento é baseado em um grande conjunto de características que descrevem aspectos bióticos, abióticos ou antrópicos do ambiente (Metzger & Casatti, 2006). As alterações dos parâmetros físico-químicos da água analisadas de forma isolada apenas, não indicam os efeitos dos poluentes ou de outros impactos sobre a biota, devendo ser utilizados estudos que combinem fatores físico-químicos e a comunidade de organismos aquáticos, entre eles os peixes. As alterações ambientais em ecossistemas aquáticos por quaisquer fatores, causam modificações na estrutura das comunidades de peixes, e por isso a utilização de comunidades ícticas como indicadores da qualidade ambiental são amplamente aceitas (Ross et al., 1985; Welcomme, 1985; Faush et al., 1990; Barrella & Petrere, 1994).

### **Estratégias para a conservação de *B. orbignyanus***

De acordo com Lopera-Barrero (2009), algumas estratégias devem ser preconizadas visando a conservação de *B. orbignyanus*. Estas estratégias envolvem o conhecimento de todos os aspectos relacionados ao manejo reprodutivo das populações em cativeiro, de programas de repovoamento, criopreservação de gametas, conservação genética, manejo dos recursos naturais, entre outros (Figura 2).

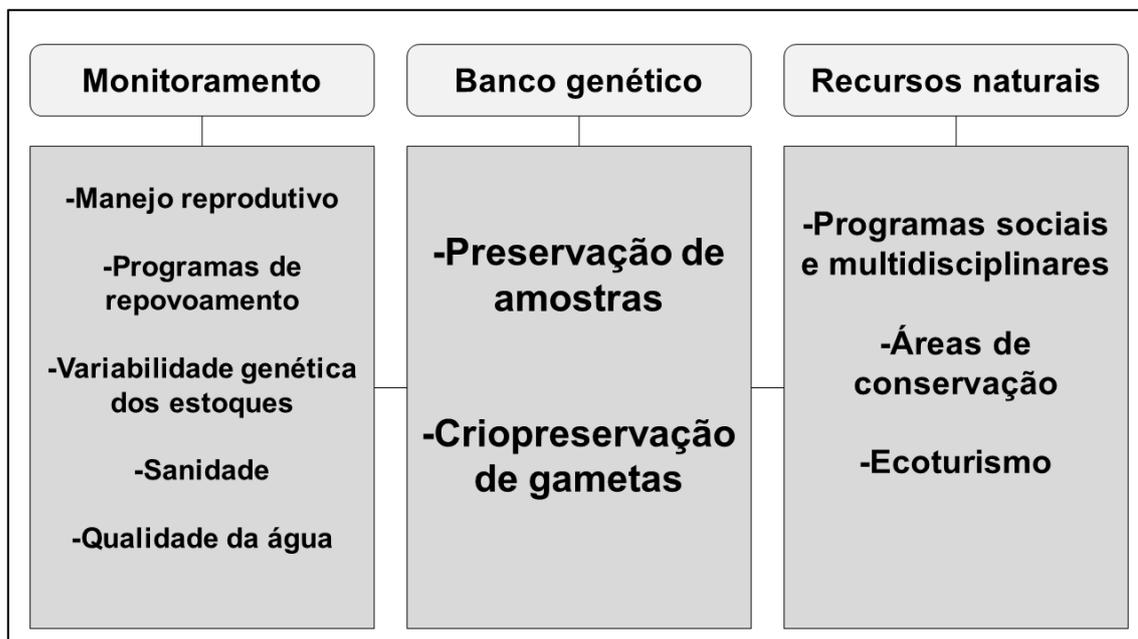


FIGURA 2. Estratégias para a conservação de *Brycon orbignyianus*. Fonte: Adaptado de Lopera-Barrero, 2009.

Em espécies e bacias onde as populações naturais já estão praticamente extintas e os efeitos da perda de variabilidade genética são irreversíveis, o repovoamento é uma das medidas de mitigação de impactos mais utilizadas no Brasil (Povh et al., 2008). Por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção e um indicador ecológico de qualidade, a piracanjuba vem sendo amplamente utilizada como objeto de pesquisa visando a sua utilização em programas ambientais (Sirol & Britto, 2006; Oliveira et al., 2017), o que fez com que inúmeros estudos neste sentido com a espécie tenham sido realizados nos últimos anos (Lopera-Barrero, 2009; Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Panarari-Antunes et al., 2011; Ashikaga, 2013). Um programa ideal de repovoamento deve permitir a sobrevivência e o estabelecimento da população introduzida, sendo necessária a adequação do manejo reprodutivo para que se evite principalmente a redução da variabilidade genética da população natural, sendo este um dos principais problemas relacionados à reintrodução de espécies nativas e apontado como uma das principais causas de extinção de espécies (Povh et al., 2008; Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Panarari-Antunes et al., 2011). Por se tratar de um problema já conhecido e frequentemente apontado como a principal causa do insucesso dos programas de repovoamento, pesquisas relacionadas ao manejo reprodutivo a partir da identificação da variabilidade genética de lotes de reprodutores de piracanjubas vem sendo realizadas em diversas regiões do Brasil (Lopera-Barrero et al., 2008a; Lopera-Barrero et al., 2008b; Lopera-Barrero et al., 2010; Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Panarari-Antunes et al., 2011; Ashikaga, 2013; Lopera-Barrero et al., 2014). Além deste, outros critérios importantes devem ser levados em consideração ao se pensar na utilização de *B. orbignyianus* como espécie indicadora em programas de conservação. Entre eles podemos citar o local e época de soltura, tamanho dos alevinos/juvenis a serem reintroduzidos,

presença de predadores, qualidade ambiental e razão sexual dos lotes reintroduzidos. A adequação de todos estes aspectos passa por um planejamento complexo na linha de produção de larvas e alevinos, desde o mapeamento genético para a formação dos planteis de reprodutores até o domínio completo das técnicas de reprodução artificial, larvicultura e alevinagem.

### **Reprodução em peixes**

A reprodução tem papel central nos processos produtivos tanto em ambientes naturais como em ambientes aquaculturais, garantindo não apenas a propagação das espécies, mas também a combinação de informações genéticas entre dois ou mais indivíduos (Strüssmann & Nakamura, 2002). Mais de 50% das espécies de vertebrados são representados pelos peixes, os quais apresentam uma enorme variedade de estratégias reprodutivas. Estas estratégias se refletem em uma grande quantidade de conjuntos anatômicos e funcionais que ao longo da evolução se adaptam às circunstâncias ambientais em que cada espécie está inserida (Redding & Patiño, 2000; Pandian, 2011). De acordo com Vazzoler (1996), estratégia reprodutiva é o conjunto de características que uma espécie deverá manifestar para obter sucesso na reprodução. No entanto, alterações ambientais podem determinar mudanças em uma ou em um conjunto destas características. Estas variáveis em uma ou mais características da estratégia reprodutiva são denominadas de táticas reprodutivas. O completo conhecimento sobre a reprodução de peixes passa pelo estudo de diversos fatores relacionados às estratégias reprodutivas, entre eles a sexualidade (mecanismo reprodutivo), tipos de desova, comportamento parental, fatores ambientais e suas relações com o comportamento reprodutivo e fatores relacionados à gametogênese (Jalabert, 2005). Todo este conhecimento é fundamental, pois garante o completo entendimento da ecologia e história de vida de uma determinada espécie. Além disso, o sucesso de programas de gestão pesqueira, aquicultura e conservação, dependem do entendimento completo das estratégias reprodutivas de cada espécie (Bone & Moore, 2008).

Entre as inúmeras táticas reprodutivas, podemos citar os “mecanismos reprodutivos” ou “sexualidade”, a qual apresenta numerosas variações naturais em peixes, incluindo o gonocorismo, hermafroditismo e unissexualidade (Devlin & Nagahama, 2002; Piferrer, 2009). O gonocorismo é o tipo de reprodução sexual mais abundante em peixes, ocorrendo em mais de 90% das espécies e presente também em anfíbios, aves e mamíferos. Caracteriza-se pela existência de sexos separados, sendo que cada indivíduo produz apenas espermatozoides ou oócitos (Piferrer, 2009). Espécies gonocorísticas podem ainda ser chamadas de diferenciadas, quando o desenvolvimento gonadal inicial procede de uma gônada indiferenciada e a mesma se desenvolve diretamente como testículo ou ovário. Também são chamadas de indiferenciadas, quando todas as gônadas se desenvolvem inicialmente como tecido ovariano, porém em aproximadamente metade da população os tecidos ovarianos se degeneram e as gônadas são invadidas por células somáticas adicionais que formam testículos (Yamamoto, 1969).

Em peixes ocorre também o hermafroditismo, tipo de reprodução em que os indivíduos produzem gametas masculinos e femininos em algum momento de sua vida (Devlin & Nagahama, 2002). Este tipo de reprodução pode

ser dividido em hermafroditismo sincrônico (ou simultâneo), onde os indivíduos produzem gametas masculinos e femininos ao mesmo tempo (ou em um período muito curto de tempo), e hermafroditismo sequencial, onde os indivíduos produzem primeiramente um tipo de gameta e depois produzem outro tipo no ciclo subsequente. Neste caso, as espécies que produzem primeiro gametas masculinos e depois femininos, são chamadas de protândricas e, caso contrário são chamadas de protogínicas (Sadovy & Shapiro, 1987). No entanto, seguindo os critérios sugeridos por Sadovy & Shapiro (1987), em espécies que muito raramente ou sob certas condições excepcionais, como contaminação química ou térmica, se encontram indivíduos com ambas as gônadas, ou contendo tecidos masculinos e femininos ou até mesmo uma gônada definida, porém com células germinativas de outro sexo, estas não podem ser classificadas como hermafroditas. Neste caso, pode estar ocorrendo o hermafroditismo anormal, ou intersexualidade, condição em que pode ser observada a presença de oócitos em pequena quantidade nos testículos, como observado por Strüssmann et al. (1996) trabalhando com peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*), ou vice-versa, porém sem relatos de funcionalidade (Pandian, 2011).

Além do gonocorismo, hermafroditismo e intersexualidade, ocorre também em peixes a unissexualidade, condição em que determinada espécie só possui fêmeas e se reproduz por partenogênese, gimnogênese ou hibridogênese (Piferrer, 2009). Portanto, todos estes mecanismos reprodutivos presentes entre os mais variados grupos taxonômicos exercem influência direta em outras táticas e características reprodutivas, como por exemplo nos mecanismos de determinação e diferenciação sexual, no tamanho e idade à primeira maturação, na gametogênese, na proporção sexual e no período reprodutivo (Vazzoler, 1996; Jalabert, 2005).

### **Proporção sexual e mecanismos de determinação e diferenciação sexual em peixes**

O conhecimento dos mecanismos e eventos que regulam a proporção entre os sexos em uma população são fundamentais para o completo entendimento da biologia e ecologia de determinada espécie, já que este é um parâmetro ecológico básico em estudos desta natureza (Piferrer, 2009). De acordo com Vazzoler (1996), a proporção sexual em peixes na natureza varia ao longo do ciclo de vida e em função de eventos sucessivos que atuam de modo distinto sobre os indivíduos de cada sexo. Desta forma, diversos fatores podem atuar de modo diferencial sobre machos e fêmeas, determinando o predomínio de um dos sexos nas diferentes fases de desenvolvimento. Entre estes fatores, destacam-se a mortalidade, o crescimento diferenciado entre sexos, comportamento diferenciado e até mesmo a disponibilidade de alimento, além de outros fatores ambientais (Vazzoler, 1996; Vicentini & Araújo, 2003).

A proporção de sexos de uma população depende da combinação entre os mecanismos de determinação e diferenciação sexual, processos que variam em função das características reprodutivas de cada espécie, conforme mencionado anteriormente. Em peixes teleósteos, o conceito de determinação e diferenciação sexual é mais complexo quando comparado a outros vertebrados. Este fato se deve à diferentes fatores, como por exemplo: ausência de conexões estruturais entre os sistemas genital e excretor; as células somáticas das

gônadas não possuem origem medular e cortical como em mamíferos; os cromossomos muitas vezes não são diferenciados em autossomos e heterossomos; dentro do grupo dos teleósteos são encontrados todos os tipos de reprodução presente em vertebrados, incluindo o gonocorismo, todos os tipos de hermafroditismo e unisexualidade (Pandian, 2011).

Os peixes, assim como os répteis apresentam dois tipos de determinação sexual: (a) genotípica (GSD = sigla advinda do termo em inglês “genetic sex determination”), onde o sexo se determina no momento da fecundação e ocorre diferenças genéticas entre os sexos e (b) ambiental (ESD = sigla advinda do termo em inglês “environmental sex determination”), onde não existem diferenças genéticas consistentes entre os sexos e o mesmo se define algum tempo após a fertilização, podendo este tempo ser em dias, meses ou anos (Valenzuela et al., 2003). Na maioria dos casos, uma proporção sexual equilibrada entre machos e fêmeas será alcançada pelas populações independentemente do sistema de determinação sexual presente na espécie (Fisher, 1930).

Diversas abordagens têm mostrado que sob condições normais, o sexo é fortemente determinado por fatores genéticos (GSD). Neste caso, alguns genes podem direcionar o desenvolvimento ovariano ou testicular e o sexo do indivíduo será estabelecido por um conjunto de fatores genéticos herdados de seus parentais (Devlin & Nagahama, 2002). Dentro de GSD, o mecanismo mais comum de determinação sexual é a partir de um sistema chamado monofatorial, ou seja, com um par único de cromossomos sexuais, podendo ser XX/XY ou WZ/ZZ. Neste caso, o sexo homogamético (XX ou ZZ) pode ser o masculino ou o feminino, variando de acordo com as diferentes espécies (Piferrer, 2009).

Em função da presença de razões sexuais desproporcionais em diferentes populações dentro de uma mesma espécie e a presença de fatores intersexuais nas gônadas de alguns indivíduos em determinadas espécies, é possível afirmar que uma grande variedade de fatores ambientais também exerce influência na determinação do sexo. Neste caso, estas influências estão mais relacionadas aos processos e mecanismos de diferenciação sexual, refletindo principalmente no sexo fenotípico dos indivíduos (Baroiller & D’cotta, 2001). Portanto, em função desta alta plasticidade nos mecanismos de determinação e diferenciação sexual em teleósteos, o sexo genotípico e fenotípico nem sempre coincidem e em inúmeras situações, as interações entre o genoma, as variáveis ambientais e demais fatores internos determinam o sexo dos indivíduos (Shapiro, 1988).

### **Fatores ambientais na determinação e diferenciação sexual**

Espécies que apresentam determinação sexual ambiental não apresentam diferenças genéticas consistentes entre os sexos, em função dos cromossomos sexuais não apresentarem diferenças morfológicas possíveis de serem identificadas por cariotipagem ou outras metodologias (Baroiller & D’Cotta, 2001; Ospina-Álvarez & Piferrer, 2008). Neste caso, as primeiras diferenças observadas entre os sexos será determinada a partir de alguma variável ambiental atuando em determinado momento do desenvolvimento da espécie, levando à determinação do sexo fenotípico dos indivíduos (Bull, 1983; Valenzuela et al., 2003).

Diferentemente de outros vertebrados como aves e mamíferos, onde o desenvolvimento embrionário ocorre sob condições ambientais controladas, em peixes isso não ocorre. Uma vez que os embriões estão expostos às condições ambientais, alterações na temperatura e outras variáveis podem ocorrer e influenciar diversos processos relacionados ao desenvolvimento embrionário e larval (Devlin & Nagahama, 2002). A temperatura e o pH são os parâmetros ambientais que mais exercem influência no processo de diferenciação sexual dos peixes (Devlin & Nagahama, 2002). Além destes, outros fatores externos como o uso de esteroides sexuais, poluição e interações sociais também podem atuar nos processos de determinação e diferenciação sexual (Devlin & Nagahama, 2002).

### **Determinação sexual por temperatura**

Inúmeros estudos mostram os efeitos da temperatura na razão sexual em peixes. Entre eles, destaca-se um pioneiro, onde Conover & Kynard (1981) observaram que a razão sexual do peixe-rei-do-Atlântico (*Menidia menidia*) sofreu influência das diferentes temperaturas de incubação, aumentando a proporção de machos em temperaturas mais elevadas (17 a 25°C) e a de fêmeas em temperaturas mais baixas (11 a 19°C). Strüssmann et al. (1996) observaram que temperaturas de 18 e 21°C levaram à uma maior quantidade de fêmeas em um trabalho realizado com larvas e alevinos de peixe-rei (*Odontesthes argentinensis*) e não houve alteração na proporção de sexos quando estes foram mantidos à 25°C. Além das alterações na razão sexual, os mesmos autores também observaram alterações importantes no desenvolvimento gonadal desta e de outra espécie (*Patagonia hatcheri*) sob diferentes temperaturas. Em ambas as espécies, as fêmeas apresentaram desenvolvimento mais acelerado na temperatura mais elevada (25°C), dando os primeiros sinais de diferenciação, como aparecimento de vasos sanguíneos e meiose das células germinativas já com 28 dias após a fertilização. No caso de *P. hatcheri*, todas as etapas do desenvolvimento ovariano se completaram mais rapidamente (42 dias) em animais mantidos a 25°C, sendo que os indivíduos mantidos a 18°C completaram o desenvolvimento gonadal apenas aos 70 dias.

Boa parte dos estudos aponta para uma razão sexual favorável aos machos quando os indivíduos são submetidos à elevadas temperaturas, como observado em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Baroiller et al., 1995; Azaza et al., 2008; Zanoni et al., 2013), tilápia-moçambicana (*O. mosambicus*) (Wang & Tsai, 2000), *Hoplosternum littorale* (Hostache et al., 1995) e *Misgurnus anguillicaudatus* (Nomura et al., 1998;). No entanto, padrões inversos também podem ocorrer, e maiores quantidades de fêmeas foram encontradas em elevadas temperaturas em espécies como o bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) (Patiño et al., 1996) e rockfish (*Sebastes schlegeli*) (Omoto et al., 2010). Além disso, em diversos estudos fica comprovada a ocorrência de interação entre GSD e a ESD, uma vez que diferentes linhagens, famílias ou populações de determinadas espécies apresentam progênies com variados graus de termossensibilidade. Este fato foi relatado em estudos realizados com peixe-rei-do-atlântico (*M. menidia*) (Conover & Kynard, 1981), truta-arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) (Magerhans et al., 2009), medaka (*Oryzias latipes*) (Selim et al., 2009) e tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) (Bezault et al., 2007).

Em um estudo detalhado, Ospina-Álvarez & Piferrer (2008) estabeleceram critérios práticos para a identificação do padrão de determinação sexual em peixes, sumarizados na figura 3. Estes critérios foram adaptados de Valenzuela et al. (2003), incluindo modificações de Conover (2004).

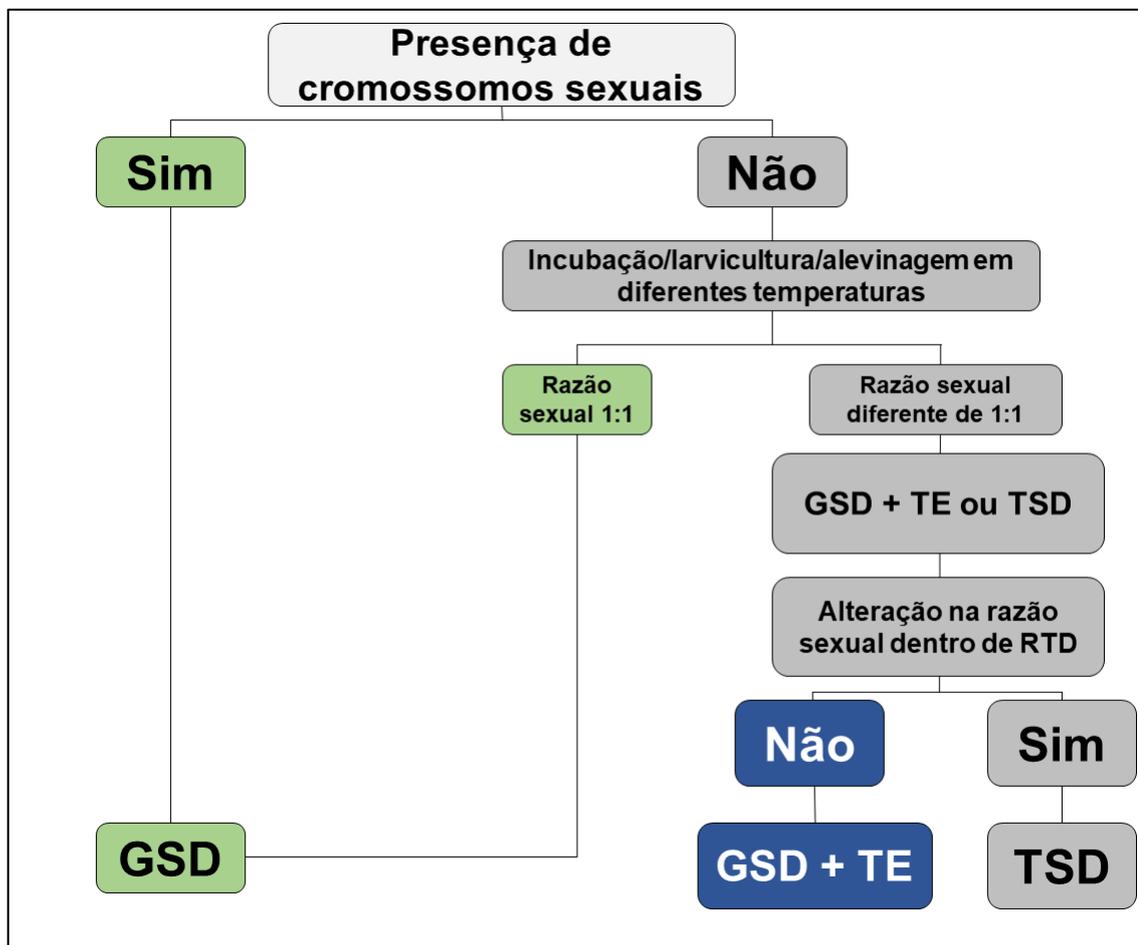


FIGURA 3. Critérios utilizados para verificar a presença de determinação sexual por temperatura (TSD), genética (GSD), ou a combinação de ambas (GSD+TE). GSD\*=genetic sex determination; TE\*=effects of temperature; TSD\*=temperature sex determination; RTD\*=range of temperature during development period. \*Siglas referentes aos termos em inglês para facilitar a leitura e comparação com demais artigos publicados na área.

Estes critérios foram estabelecidos a partir de uma extensa revisão englobando estudos realizados com 59 espécies de peixes gonocóricas de água doce, água salgada e estuarinas. De acordo com estes autores, a presença de cromossomos sexuais como XX/XY ou WZ/ZZ por exemplo, constitui uma forte evidência de GSD. Caso não seja evidenciada a presença de cromossomos sexuais, outros critérios serão utilizados para identificar o padrão de determinação sexual. Dentre estes critérios, a aplicação de temperaturas extremas e ecologicamente irrelevantes para determinada espécie, mesmo exercendo influências na razão sexual, não nos permite afirmar que a espécie

apresenta determinação sexual por temperatura (TSD = sigla advinda do termo em inglês “temperature sex determination”). Esta afirmação só é válida caso tenha ocorrido alterações na razão sexual em temperaturas aplicadas dentro do período termo sensível (RTD = sigla advinda do termo em inglês “range of temperatures during the development period”). Caso tenha ocorrido alterações dentro da faixa natural de desenvolvimento da espécie, porém fora do período termo sensível, pode estar ocorrendo determinação sexual genética com efeito da temperatura (GSD+TE = sigla advinda do termo em inglês “genetic sex determination + temperature effects”). O período termo sensível, também denominado de período lábil coincide com o início dos processos de diferenciação sexual e gonadal, onde histologicamente já se torna possível estabelecer o direcionamento das divisões celulares (Conover & Fleisher, 1986; Strüssmann et al., 1997; Baroiller et al., 1999; Goto et al., 1999; Koumoundouris et al., 2002).

Desta forma, mesmo em espécies que apresentam sexos genéticos distintos e cromossomos sexuais claramente identificados, pode ocorrer influências ambientais (principalmente da temperatura) na determinação do sexo, ainda que este fato se observe apenas fenotipicamente (Uchida et al., 2004). A determinação sexual é controlada pela ação de uma grande variedade de rotas bioquímicas envolvendo uma grande quantidade de proteínas (fatores de transcrição, enzimas esteroidogênicas, receptores, etc.). Uma vez que a temperatura pode influenciar drasticamente a estrutura e funções das proteínas e outras macromoléculas, as flutuações de temperatura enfrentadas pelos peixes em seus respectivos habitats, podem alterar os direcionamentos da determinação e diferenciação sexual, alterando conseqüentemente a probabilidade do desenvolvimento de machos ou fêmeas (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002). É provável que a temperatura exerça suas ações nas rotas metabólicas das biossínteses de esteroides principalmente a nível cerebral. Embora ainda seja necessária uma maior quantidade de estudos específicos sobre o tema, é possível afirmar que a principal atuação da temperatura nestes mecanismos esteja relacionada com a repressão/inibição da enzima aromatase, a qual está diretamente relacionada com a biossíntese de  $17\beta$ -estradiol a partir da testosterona (KITANO *et al.*, 1999).

No entanto, cabe salientar que os tratamentos térmicos aplicados preferencialmente devem ser realizados nos períodos corretos do desenvolvimento dos indivíduos para uma maior certeza de sua efetividade. O período em que se inicia a diferenciação sexual varia conforme a espécie, podendo se iniciar já nas primeiras semanas de vida ou levar meses (Patiño et al., 1996; Strüssmann et al., 1997; Goto-Kazeto et al., 2006). Indicando assim a necessidade de estudos prévios quando se objetiva aplicar metodologias de manipulação sexual.

### **Desenvolvimento gonadal e gametogênese**

No início da embriogênese, o sexo dos peixes ainda não está definido morfológicamente, já que não possui gônadas diferenciadas em testículos ou ovários e nenhuma outra característica associada ao sistema reprodutor desenvolvida (Cesar et al., 2005). As gônadas indiferenciadas, assim como em outros vertebrados, se diferenciam em ovários ou testículos durante o

desenvolvimento ontogenético, e os mecanismos que regulam este processo são influenciados por efeitos genéticos e ambientais, os quais se refletem em sinalizações químicas hormonais para direcionar o destino da diferenciação (Nakamura et al., 1998; Devlin & Nagahama, 2002).

As gônadas indiferenciadas possuem basicamente células germinativas primordiais (CGP) e células somáticas (CS), as quais neste período ainda são pluripotentes, podendo dar origem a uma gônada masculina ou feminina (Cesar et al., 2005). Assim como em outros vertebrados, as células germinativas primordiais diferenciam-se a partir de células do saco vitelino, migrando de regiões extragonadais para a crista gonadal, órgão que dará origem ao ovário ou testículo (Nieuwkoop & Sutasurya, 1976; Otani et al., 2005). A partir da migração das CGP, o processo de diferenciação gonadal é regulado por complexas interações entre gonadotrofinas e esteroides sexuais produzidos tanto em nível gonadal quanto cerebral (Devlin e Nagaham, 2002). Estes esteroides sexuais têm atuação local nas CGP, mas também atuam como hormônios endócrinos relacionados a outros tipos de células e órgãos envolvidos na diferenciação sexual (Devlin & Nagahama, 2002).

As gônadas rudimentares passam por um período de baixo crescimento somático, sem diferenciação histológica aparente e baixa atividade germinativa. Este período pode durar dias, meses ou até mesmo anos dependendo da espécie (Strüssmann & Nakamura, 2002). Este período de inatividade é seguido pelo aparecimento de características histológicas que sinalizam a diferenciação ovariana ou testicular em espécies gonocorísticas diferenciadas, e início da diferenciação ovariana ou fase intersexual em espécies gonocorísticas indiferenciadas (Yamamoto, 1969; Strüssmann & Nakamura, 2002). Ao longo da morfogênese gonadal, uma série de modificações estruturais ocorre, tanto nas células somáticas, quanto nas células germinativas (Strüssmann e Nakamura, 2002), incluindo divisões mitóticas de oogônias ou espermatogônias (García-Alonso et al., 2009), e mudanças estruturais a partir das células somáticas. Estas alterações é que darão origem à formação da cavidade ovariana e dos ductos espermáticos e lóbulos testiculares (Strüssmann & Nakamura, 2002).

Para melhor compreender os processos da morfogênese gonadal, é de extrema importância o conhecimento dos diferentes tipos de testículos e ovários que ocorrem em teleósteos. De acordo com Hoar (1969) há dois tipos de organização ovariana, a cisto-ovariana e gymno-ovariana. No primeiro tipo de organização, os ovários são órgãos cavitários e apresentam o compartimento germinativo em forma de lamelas que se projetam em direção à luz do órgão. Neste caso, os gonoductos se unem caudalmente e desembocam na papila urogenital. Na organização gymno-ovariana, os ovários apresentam lamelas ovígeras expostas diretamente para a cavidade celomática, onde os oócitos maduros são diretamente liberados (Grier et al., 2007). Em relação à organização testicular, em teleósteos são observados dois tipos de testículos (Grier et al., 1980), o lobular e o tubular anastomosado. O testículo lobular ainda pode ser dividido em lobular irrestrito, quando as espermatogônias se distribuem de maneira irrestrita ao longo dos lóbulos, ou restrito, onde as mesmas se restringem à porção terminal dos lóbulos.

Algumas características histológicas como intensa proliferação mitótica das células germinativas, entrada das células germinativas em meiose formando os oócitos em crescimento primário e reorganização das células somáticas formando a cavidade ovariana indicam o início da diferenciação gonadal feminina (Strüssmann & Nakamura, 2002; Mazzoni et al., 2010). Além disso, outros sinais de diferenciação gonadal feminina incluem o aumento da quantidade de vasos sanguíneos e o maior tamanho relativo da gônada (Strüssmann e Nakamura et al., 2002). Já na diferenciação testicular, um dos primeiros sinais histológicos é o início da formação do ducto espermático, seguido pelo aparecimento de vasos sanguíneos e formação dos lóbulos testiculares (Nakamura et al., 1998; Strüssmann & Nakamura, 2002). Em animais que apresentam testículos com organização do tipo tubular anastomosada, o início da diferenciação sexual é marcado pela reorganização das células germinativas e somáticas, formando o epitélio germinativo (Mazzoni, 2009).

A idade em que se inicia a morfogênese gonadal e o tempo em que o processo se completa varia entre as diferentes espécies. Inúmeros autores afirmam que a diferenciação ovariana geralmente se inicia antes da diferenciação testicular (Guraya, 1994; Nakamura et al., 1998; Meijide et al., 2005; Mazzoni et al., 2010; Mazzoni, 2013; Pan et al., 2017). Dentre os vários trabalhos neste sentido, foi observado que em *Cichlasoma dimerius*, aos 42 dias após a fertilização (DAF) os principais eventos da diferenciação ovariana, como início de atividade meiótica, aparecimento de capilares sanguíneos e início da foliculogênese, já estavam ocorrendo, enquanto os sinais de diferenciação testicular foram inicialmente observados aos 72 DAF (Meijide et al., 2005). Neste estudo, a cavidade ovariana completou seu desenvolvimento aos 65 DAF, enquanto a organização testicular completa só foi observada aos 100 DAF. De maneira semelhante, em *Cyprinus carpio*, as gônadas foram consideradas indiferenciadas até os 50 DAF e os primeiros sinais de diferenciação ovariana foram observados aos 60 DAF, enquanto os processos de diferenciação testicular foram identificados apenas aos 75 DAF (Mazzoni, 2009; Mazzoni et al., 2010). No entanto, neste estudo com *C. carpio*, apesar do processo de diferenciação ovariana se iniciar antes, a formação do epitélio germinativo só se completou aos 180 DAF, enquanto que nos machos, a diferenciação testicular se iniciou depois, porém a formação do epitélio germinativo se deu aos 95 DAF. Em dois estudos realizados com peixes reofílicos neotropicais (*Piaractus mesopotamicus* e *Leporinus friderici*), também foi observado que a diferenciação ovariana precede a diferenciação testicular, com os primeiros indícios de formação dos ovários aos 150 DAF nas duas espécies, idade em que ainda não se observou nenhum indicio de diferenciação testicular em nenhum indivíduo (Barbosa, 2015; Souza, 2015).

Estudos morfológicos dos processos de diferenciação sexual e gonadal servem como base para o entendimento de vários aspectos reprodutivos, como tamanho e idade a primeira maturação, período reprodutivo, tipos de desova, além de outros aspectos comportamentais de determinada espécie, incluindo os ciclos anuais e uso e ocupação de habitats. Além disso, estudos detalhados sobre a morfogênese gonadal são importantes para o melhor entendimento e direcionamento da aplicação de métodos de manipulação

sexual, ferramenta amplamente utilizada atualmente na aquicultura mundial, tanto para fins produtivos, a partir da produção de lotes monosexo, como para fins de conservação, buscando-se lotes sexualmente equilibrados.

### **Ciclo reprodutivo**

Na maioria das espécies de peixes, a reprodução é cíclica e sazonal, determinando uma série de modificações morfo-fisiológicas em suas gônadas (Nagahama, 1983). O ciclo e o ritmo reprodutivo ocorrem em função da variação das condições ambientais, o que possibilita que a reprodução na natureza ocorra em épocas mais favoráveis à sobrevivência da prole (Schwassmann, 1971). Em regiões temperadas, a temperatura e o fotoperíodo são considerados os principais fatores moduladores da atividade reprodutiva em peixes (Volpato & Trajano, 2006). Já em regiões tropicais, onde a amplitude térmica é menor, o aumento da precipitação e nível pluviométrico parecem exercer influências mais diretas sobre os ritmos reprodutivos (Bone & Marshall, 1982). O ciclo reprodutivo de determinada espécie também varia de acordo com o tipo de desenvolvimento e liberação dos gametas. Peixes teleósteos ovíparos podem ser separados em dois grupos, de acordo com a estratégia de liberação de gametas (desova ou espermeação): as espécies semélperas, que apresentam um único evento de desova em sua vida, e espécies iteróparas, que apresentam vários eventos reprodutivos ao longo de sua vida (Núñez & Duponchelle, 2008). As espécies iteróparas podem ser divididas em dois grupos conforme o tipo de desenvolvimento dos gametas (Vazzoler, 1996): o primeiro grupo é composto por espécies que realizam apenas um evento reprodutivo ao longo do ano (desova total) e o segundo grupo é representado pelas espécies que realizam várias desovas durante o período reprodutivo (desova parcelada). Desta forma, além das influências ambientais, os processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento gonadal e nos ritmos reprodutivos dos peixes variam de acordo com cada grupo taxonômico e de acordo com as estratégias reprodutivas de cada espécie (Balon, 1975).

Os ciclos reprodutivos basicamente podem ser determinados a partir da avaliação de um conjunto de características morfológicas das gônadas, das células germinativas de cada linhagem gametogênica e da distribuição destas células ao longo do tecido gonadal (Veloso-Júnior et al., 2009). Estas características são traduzidas em diferentes fases reprodutivas, as quais representam a descrição dos eventos cíclicos necessários para a produção e liberação de gametas viáveis (Brown-Peterson et al., 2011). Muitos autores utilizam diferentes classificações e nomenclaturas para representar determinada fase ou etapa reprodutiva e assim descrever os eventos celulares que estão ocorrendo a nível gonadal. Esta falta de padronização dificulta a comparação entre estudos semelhantes com espécies diferentes. No entanto, é consenso entre os autores que para descrever uma etapa ou fase reprodutiva, é necessário agregar aos estudos morfológicos, observações de campo, interpretação de dados biométricos e o uso de índices biológicos, como o índice gonadossomático (IGS), por exemplo (Vazzoler, 1996).

Visando criar uma padronização para os diferentes termos que muitas vezes descrevem fases reprodutivas semelhantes, Brown-Peterson et al. (2011)

desenvolveram um modelo conceitual para identificar fases críticas dentro do ciclo reprodutivo, tanto para machos como para fêmeas (Tabelas 1 e 2).

TABELA 1. Características macro e microscópicas das fases presentes no ciclo reprodutivo de fêmeas. O tempo de cada fase é espécie-dependente e alguns critérios podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva ou temperatura da água.

| <b>Fase reprodutiva</b> | <b>Terminologia anterior</b>   | <b>Características macro e microscópicas</b>   |
|-------------------------|--|--|
| <b>Imaturo</b>          | Imaturo, virgem  | Ovários pequenos, claros e sem vasos sanguíneos. Apenas oogônias e oócitos em crescimento primário. Parede ovariana fina e pouco espaço entre os oócitos.  |
| <b>Desenvolvimento</b>  | Em maturação, desenvolvimento inicial, maturação inicial, maturação intermediária, amadurecimento, pré-vitelogênico.   | Ovários em expansão, vasos sanguíneos passam a ser mais distintos. Oócitos em crescimento primário; com alvéolos corticais; oócitos vitelogênicos primários e secundários. Sem evidência de folículos pós-ovulatórios e oócitos vitelogênicos finais. Alguns oócitos atrésicos podem ser visualizados.<br><i>Subfase desenvolvimento inicial:</i> apenas oócitos em crescimento primário e com alvéolos corticais. |
| <b>Apto à desova</b>    | Maduro, desenvolvimento tardio, maturação tardia, totalmente maduro, grávida, vitelogênese, totalmente desenvolvido, parcialmente esvaziado, pré-desova, ovulado, desovando. | Ovários grandes, vasos sanguíneos evidentes. Oócitos visíveis macroscopicamente. Presença de oócitos vitelogênicos finais. Atresias e folículos desovados tardios podem estar presentes.<br><i>Subfase desova ativa:</i> presença de oócitos em maturação final, ovulando ou folículos pós-ovulatórios.  |
| <b>Regressão</b>        | Esgotado, regressão, pós-desova, recuperação.  | Ovários flácidos, vasos sanguíneos proeminentes. Atresia e folículos pós-ovulatórios presentes. Oócitos com alvéolos corticais e vitelogênicos primários e secundários podem estar presentes.  |
| <b>Regeneração</b>      | Em repouso, regredido, em recuperação, inativo.  | Ovários pequenos, vasos sanguíneos reduzidos. Apenas oogônias e oócitos em crescimento primário. Vasos sanguíneos dilatados, folículos atrésicos ou folículos pós-ovulatórios em degeneração podem estar presentes.  |

Fonte: Adaptado de Brown-Peterson et al., 2011.

TABELA 2. Características macro e microscópicas das fases presentes no ciclo reprodutivo de machos. O tempo de cada fase é espécie-dependente e alguns critérios podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva ou temperatura da água.

| Fase reprodutiva       | Terminologia anterior   | Características macro e microscópicas   |
|------------------------|---|---|
| Imaturo                | Imaturo, virgem   | Testículos pequenos, translúcidos e filiformes. Somente Eg1 presentes. Lúmen dos túbulos imperceptível.   |
| Desenvolvimento        | Em maturação, desenvolvimento inicial, maturação inicial, amadurecimento  | Testículos pequenos, mas facilmente identificáveis. Espermatocistos evidentes ao longo dos lóbulos/túbulos seminíferos. Eg2, Et1, Et2, Ed e Ez podem estar presentes no interior dos espermatocistos. Ez não presentes no lúmen dos túbulos seminíferos ou ductos espermáticos. Epitélio germinativo contínuo ao longo de todo o testículo.<br><i>Subfase desenvolvimento inicial:</i> apenas Eg1, Eg2 e Et1 presentes nos espermatocistos.   |
| Apto à liberar esperma | Desenvolvimento tardio, maturação intermediária, maturação final, maduro, parcialmente esgotado, maturando, maduro, liberando esperma | Testículos grandes e firmes. Ez no lúmen dos lóbulos ou ductos espermáticos. Todos os estágios da espermatogênese (Eg1, Eg2, Et1, Et2, Ed e Ez) podem estar presentes. Espermatogênese ativa e o <u>epitélio germinativo pode ser contínuo ou descontínuo.</u><br><i>Subfase liberação ativa de esperma:</i> sêmen liberado sob leve pressão abdominal. <i>Epitélio germinativo inicial:</i> epitélio germinativo contínuo em todos os lóbulos testiculares; <i>Epitélio germinativo intermediário:</i> epitélio germinativo descontínuo nas proximidades do ducto espermático; <i>Epitélio germinativo final:</i> epitélio germinativo descontínuo ao longo de todo o testículo. |
| Regressão              | Esgotado, regressão, pós-liberação de esperma, recuperação.   | Testículos pequenos e flácidos, sem liberação de sêmen após pressão. Ez residuais presentes no lúmen dos lóbulos ou ductos espermáticos. Espermatocistos espalhados próximos da periferia contendo Et2, Ed e Ez. Praticamente não há espermatogênese ativa e ocorre regeneração do epitélio germinativo nas periferias dos testículos.  |
| Regeneração            | Em repouso, regredido, em recuperação, inativo.   | Testículos pequenos, filiformes. Espermatocistos e lúmen não são observados. Eg em proliferação por todo testículo. Epitélio seminífero contínuo. Et podem estar ausentes. Ez residuais ocasionalmente presentes no lúmen dos lóbulos/túbulos seminíferos e ducto espermático.  |

Eg1=espermatogônias primárias; Eg2=espermatogônias secundárias; Et1=espermatócitos primários; Et2=espermatócitos secundários; Ed=espermátides; Ez=espermatozoides. Fonte: Adaptado de Brown-Peterson et al., 2011.

Este modelo conceitual foi desenvolvido para peixes teleósteos gonocorísticas marinhas, porém pode ser facilmente adaptado para espécies de água doce de diferentes estratégias reprodutivas. Assim como pode ser também adaptado para descrever o ciclo reprodutivo destas mesmas espécies quando estão sob condições de cativeiro. Apesar de alguns eventos não ocorrerem de maneira natural na grande maioria das espécies comerciais em condições de cultivo, as fases críticas ao longo do ciclo reprodutivo são semelhantes.

Em cativeiro, a reprodução pode ser controlada por vários fatores ambientais, como fotoperíodo, temperatura da água, utilização de substratos artificiais, entre outros. No entanto, a ecobiologia de algumas espécies não é ainda bem conhecida, ou muitas vezes é impossível simular as condições ambientais necessárias para que determinadas espécies expressem o seu comportamento reprodutivo ideal, como a migração por exemplo (Volpato & Trajano, 2006; Mylonas et al., 2010). Nestes casos, o ciclo reprodutivo é incompleto e, na maioria das vezes esta interrupção se dá nas etapas mais avançadas da reprodução, como espermiogênese/maturação final e liberação dos gametas (Mylonas et al., 2010). Devido ao fato de que estas espécies não se reproduzem naturalmente em condições de cultivo, a reprodução é conduzida de maneira artificial através da indução hormonal, selecionando-se neste caso machos e fêmeas que atingiram a maturidade sexual e estão aptos à reprodução (Romagosa et al., 2003; Batlouni et al., 2006).

## HIPÓTESES

A proporção sexual de *B. orbignyana* mantidos em condições convencionais de cultivo apresenta desequilíbrio.

Há diferenças consistentes no crescimento e padrões morfológicos entre os sexos.

O fator de condição se altera entre indivíduos indiferenciados, machos e fêmeas e entre as estações do ano.

O período e os processos de diferenciação sexual apresentam os mesmos padrões entre os sexos.

O período de diferenciação sexual está relacionado ao tamanho ou a idade dos indivíduos.

## OBJETIVOS

### **Geral**

Avaliar parâmetros populacionais e reprodutivos de *B. orbignyana* mantidos sob condições de cultivo.

### **Específicos**

Verificar a proporção sexual de lotes de *B. orbignyana* sob condições de cultivo;

Identificar diferenças nos padrões de crescimento entre machos e fêmeas;

Avaliar as alterações no fator de condição e parâmetros de crescimento ao longo do desenvolvimento ontogenético;

Descrever os processos de diferenciação sexual;

Identificar o período termossensível a fim de propor metodologias de manipulação sexual;

Descrever o ciclo reprodutivo de machos;

Validar uma escala de maturação para a espécie levando em consideração as fases reprodutivas ao longo do ciclo em cativeiro.

## **CAPÍTULO II\***

## RAZÃO SEXUAL, RELAÇÃO PESO-COMPIMENTO E FATOR DE CONDIÇÃO EM PIRACANJUBAS CULTIVADAS\*

Éverton Luís ZARDO<sup>1</sup> e Danilo Pedro STREIT JR<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS, Brasil. Avenida Bento Gonçalves, 7712, Agronomia, CEP: 91540-000. E-mail:everton\_zardo@hotmail.com.

\*Pesquisa financiada pela Energética Barra Grande S.A. (BAESA), Energética Campos Novos S.A. (ENERCAN) e CNPq.

### RESUMO

Este estudo tem por objetivo avaliar aspectos da estrutura populacional como relação peso-comprimento, crescimento, razão sexual e fator de condição em *Brycon orbignyanus* provenientes de cultivo. Quinhentos exemplares foram amostrados de uma piscicultura comercial e os dados biométricos registrados (Peso total e Comprimento total). O sexo de 307 exemplares foi identificado através de análise histológica ou visualização externa dos caracteres sexuais secundários. A razão sexual apresentou desproporções de acordo com as classes de comprimento. Tanto os machos quanto as fêmeas apresentaram crescimento alométrico positivo ( $b=3,35$  e  $b=3,44$ ), enquanto indivíduos sexualmente indiferenciados apresentaram crescimento isométrico ( $b=2,96$ ). O fator de condição foi mais elevado nos indivíduos indiferenciados e durante o verão, considerando todas as classes agrupadas.

Palavras Chaves: *Brycon orbignyanus*, crescimento, estrutura populacional.

## SEXUAL RATIO, WEIGHT-LENGTH RELATIONSHIP AND CONDITION FATOR IN CULTIVATED PIRACANJUBAS

### ABSTRACT

The objective of this study was evaluate aspects of population structure as weight-length relationship, growth, sex ratio and condition factor in cultured *Brycon orbignyanus*. Five hundred specimens were sampled from a commercial fish farm and biometric data were recorded (Total Weight and Total Length). The sex of 307 specimens was identified through histological analysis or external visualization of the secondary sexual characters. The sex ratio showed disproportions in different classes. Both males and females showed positive allometric growth ( $b = 3.35$  and  $b = 3.44$ ), while undifferentiated individuals showed isometric growth ( $b = 2.96$ ). The condition factor was higher in undifferentiated individuals and during the summer, considering all classes.

Key words: *Brycon orbignyanus*, growth, population structure.

### INTRODUÇÃO

As populações naturais de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (VALENCIENNES, 1850) vêm apresentando um declínio drástico nos últimos anos em função da redução da oferta de alimento natural devido ao desmatamento, degradação da qualidade da água, pesca predatória, construção de barragens para empreendimentos hidrelétricos, entre outros (PAIVA, 1982; AGOSTINHO *et al.*, 2005). Estes fatores, aliados a alta sensibilidade da espécie à ambientes alterados, determinam que a piracanjuba figure atualmente entre as espécies ameaçadas de extinção a nível nacional, considerada “criticamente em perigo” no Estado do Rio Grande do Sul (MACHADO *et al.*, 2005). Na bacia do rio Uruguai, os registros de capturas são raros e restritos à trechos do rio Uruguai próximos ao Parque Estadual do Turvo (ZANIBONI-FILHO & SCHULZ, 2003).

Em função desta severa queda dos estoques naturais, medidas para a conservação e/ou reintrodução da espécie nos ambientes naturais de origem devem ser imediatamente encontradas. Uma vez que *B. orbignyanus* vem sendo amplamente utilizada em programas de repovoamento, estudos relacionados à dinâmica populacional em condições de cultivo tornam-se importantes para a obtenção de respostas a respeito da adaptação a novos ambientes e avaliação do sucesso de programas de reintrodução.

Estudos populacionais relacionados à razão sexual, relação peso/comprimento e fator de condição de uma população nos fornecem informações relevantes sobre o crescimento relativo e o padrão de crescimento (alométrico ou isométrico) de determinada espécie. Além disso, nos fornecem informações importantes sobre o grau de higidez ou bem-estar fisiológico em determinado ambiente, informações a respeito do período reprodutivo, além de outros aspectos bioecológicos relacionados a estruturação populacional e adaptações morfológicas ao longo do desenvolvimento (LECREN, 1951; GOMIERO e BRAGA, 2003). Desta forma, este método não-letal de pesquisa fornece elementos que podem ser utilizados na compreensão do funcionamento de um ecossistema e como ferramentas para a melhoria do manejo de populações naturais e em cativeiro (TAVARES-DIAS *et al.*, 2010). Além disto, pode ser usado como um comparativo entre diferentes populações da mesma espécie, uma vez que os parâmetros podem variar a partir das diferentes características bióticas e abióticas na qual determinada população está inserida.

Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as flutuações na razão sexual em diferentes classes de comprimento, o padrão de crescimento e o fator de condição de indivíduos sexualmente indiferenciados, machos e fêmeas de piracanjubas mantidas em condições semi-intensivas de cultivo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Animais*

Os exemplares de *B. orbignyana* foram obtidos a partir de reprodução induzida com Extrato Hipofisário de Carpa (EHC) seguindo recomendações de ZANIBONI-FILHO e BARBOSA (1996), a partir de reprodutores provenientes de uma estação piscicultura comercial localizada no município de Paulo Lopes, Estado de Santa Catarina, Brasil. Os reprodutores fazem parte de um plantel originário da bacia do rio Uruguai e foram mantidos em tanques de terra escavados de 2000 m<sup>2</sup>.

Após a reprodução induzida, eclosão e alimentação inicial, os juvenis foram mantidos em tanques de terra escavados de 600 m<sup>2</sup>, a uma densidade inicial de 0,5 peixes/m<sup>2</sup> sendo alimentados com ração comercial extrusada (32 e 28%, respectivamente) fornecida até saciedade aparente duas vezes ao dia.

### *Delineamento experimental*

Quando os juvenis completaram três semanas de vida, coletas semanais se iniciaram até o 45º dia de vida. Posteriormente, foram realizadas coletas mensais até os animais completarem um ano, e por fim, sazonais até completarem 2 anos de idade. Também foram realizadas amostragens de animais adultos (acima de 2 anos) aleatoriamente em lotes mantidos na piscicultura nas quatro estações climáticas do ano. Em cada amostragem foram coletados 15 exemplares, os quais foram anestesiados com solução aquosa de Benzocaína (ROSS e ROSS, 2008) e eutanasiados por secção medular para a dissecação e retirada das gônadas. Os seguintes dados biométricos foram obtidos: Peso total (PT); Comprimento Total (CT) e Comprimento Padrão (CP). Os animais adultos coletados durante o período reprodutivo não foram sacrificados, apenas coletados os dados biométricos, o sexo identificado e em seguida foram devolvidos aos tanques. Os procedimentos de coleta foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), sob protocolo de autorização nº 23841.

O sexo dos animais foi obtido por análise histológica, onde as gônadas extraídas foram desidratadas em séries alcoólicas (70, 80 e 95% por 24 horas cada), infiltradas e incluídas em Historessina Leica (Metacrilato Glicol). Secções de 3µm foram obtidas em um micrótomo Leica RM2245 com navalhas de vidro ou tungstênio e coradas com Azul de Toluidina. As lâminas foram fotografadas com um microscópio Nikon E200, acoplado a uma Câmera Digital CMOS com Software série 4076. Em animais adultos, o sexo foi verificado por características reprodutivas secundárias, onde os machos apresentaram o primeiro raio da nadadeira anal serrilhada e as fêmeas o abdômen abaulado e papila urogenital avermelhada. No total dos 500 indivíduos coletados e analisados, foi realizada a sexagem em 61,8% dos exemplares (n=309).

#### *Análise dos dados*

A razão sexual foi avaliada considerando todos os indivíduos agrupados e separadamente por classes de comprimento. Foram definidas nove classes de comprimento de acordo com a regra de Sturges (Sturges, 1926):  $W = R/K$ , onde  $W$  é a amplitude das classes;  $K$  é o número de classes  $[1 + (3,222 \cdot \log N)]$ , sendo que  $N$  é o número de espécimes coletados e  $R$  é a amplitude total dos dados de comprimento total.

Para esta análise foi realizado o teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) (proporções esperadas iguais), considerando 5% de significância.

A relação peso/comprimento foi obtida separadamente em animais considerados indiferenciados, machos e fêmeas, sendo expressa pela equação:  $PT = a \times CT^b$ , onde PT = peso total (g); a = coeficiente linear/intercepto; CT = comprimento total (cm) e b = coeficiente angular/coeficiente de alometria, relacionado com a forma de crescimento. Os parâmetros a e b foram obtidos ajustando-se o logaritmo das variáveis dependente (peso; LnPT) e independente (comprimento; LnCT) pelo método dos mínimos quadrados (SANTOS, 1978), obtendo-se a seguinte equação:  $\log(PT) = \log(a) + b \times \log(CT)$ . Desta forma, a e b foram estimados a partir de uma regressão linear e aplicados na fórmula:  $PT = a \times CT^b$ . A partir desta, foi possível estimar o peso em função do comprimento e vice-versa, além de estimar o tipo de crescimento da espécie, representado pelo coeficiente de alometria (b) e o padrão de incorporação de peso ao longo do crescimento. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi calculado para expressar a proporção de variação total da variável peso (dependente) que é explicada pela variação do comprimento (variável independente).

O fator de condição alométrico (K) foi calculado através da fórmula (LE CREN, 1951):  $K = PT / CT^b$ , onde: PT = peso total; CT = comprimento total; b = coeficiente de alometria, obtido a partir da regressão linear. Para a constante b foi considerado o valor separadamente por sexo e por estação do ano para evitar possíveis distorções nos parâmetros analisados (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2002). As médias do fator de condição total (K) foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e como não apresentaram distribuição normal, foram comparadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando 5% de significância. Este parâmetro foi comparado entre os indivíduos indiferenciados, machos e fêmeas e entre as estações do ano. Neste último caso, foram considerados também os indivíduos sem identificação sexual. As variações no fator de condição (K) e nos parâmetros de crescimento foram analisadas graficamente (CATANHÊDE *et al.*, 2007).

## RESULTADOS

Ao longo do período de estudo foram coletados 500 exemplares de *B. orbignyana*, com o comprimento total variando entre 3,6 e 49 cm e peso entre 0,62 e 1448

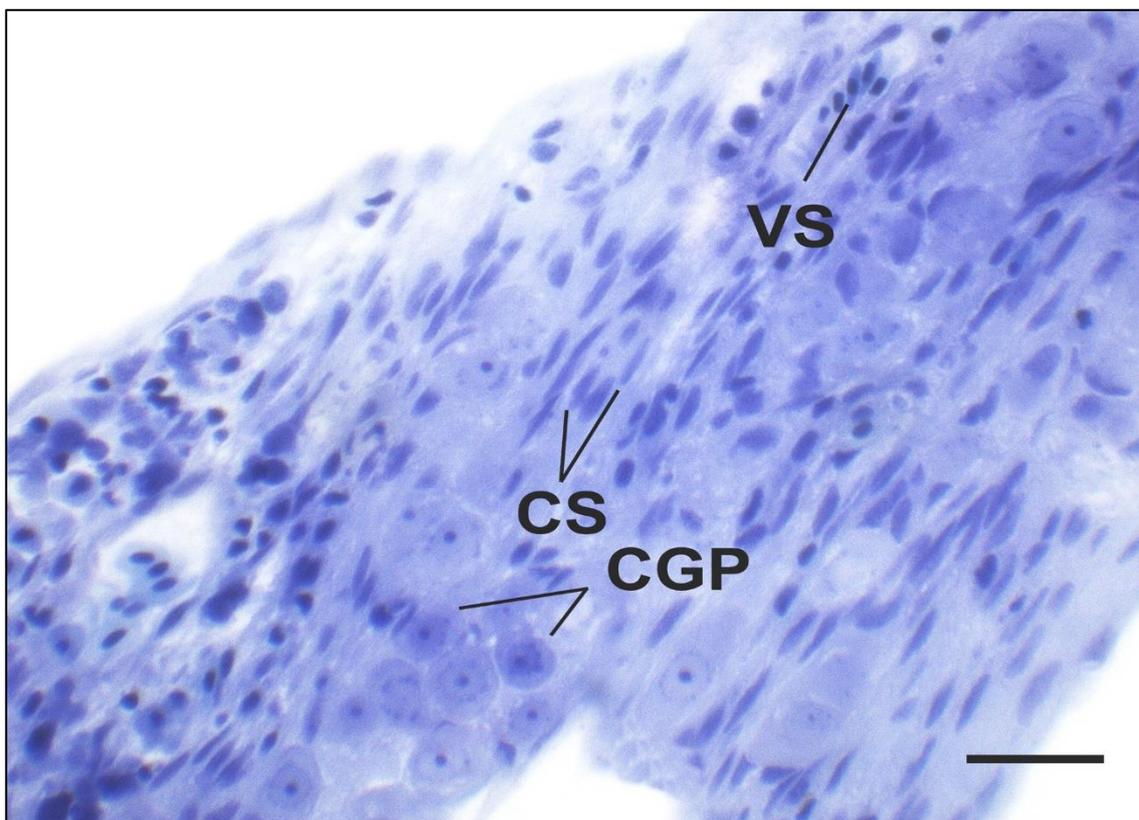
g. Os dados biométricos referentes aos indivíduos sexados encontram-se sumarizados na tabela 1.

**Tabela 1.** Dados biométricos dos indivíduos de *Brycon orbignyianus* coletados. N = número amostral; CT = comprimento total médio (cm); PT = peso total médio (g); Ind. = indiferenciados.

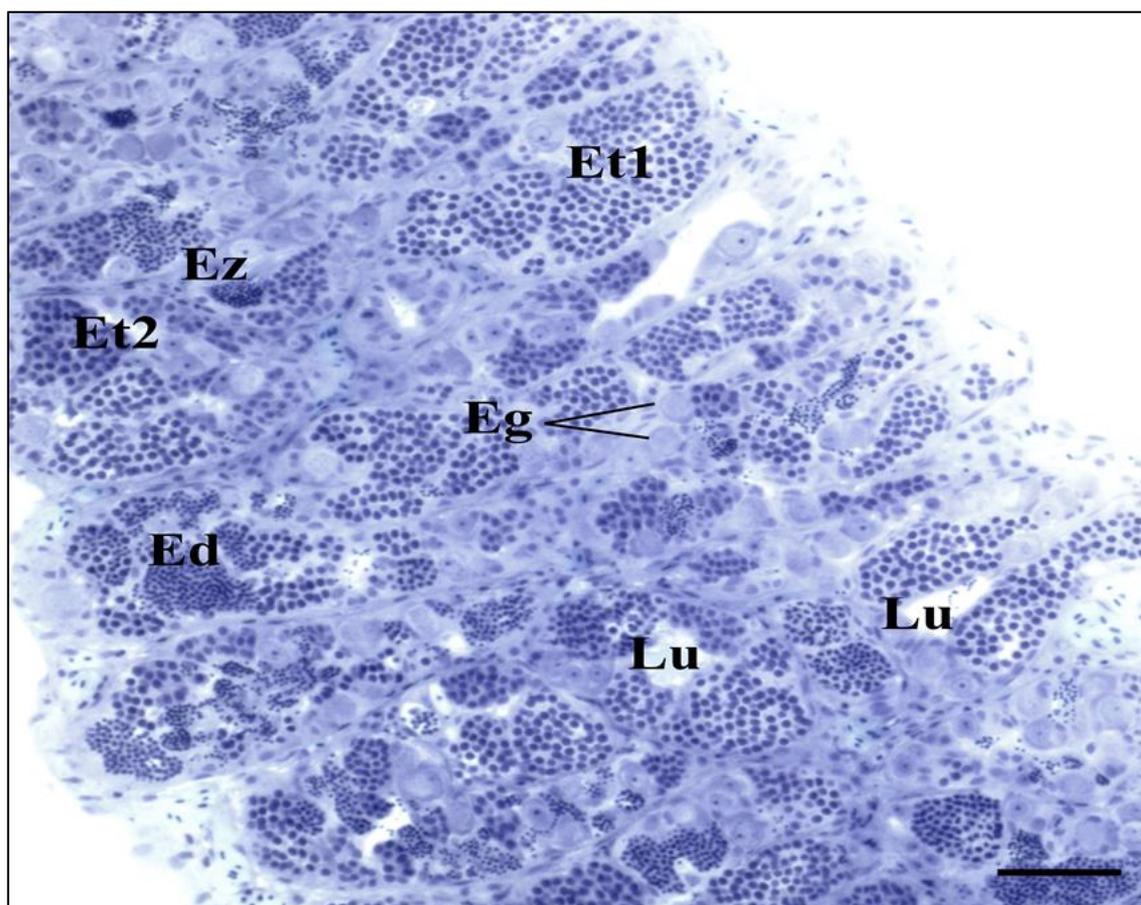
| Sexo          | N*  | CT          | PT             | CT   | CT   | PT    | PT   |
|---------------|-----|-------------|----------------|------|------|-------|------|
|               |     |             |                | mín. | máx. | mín.  | máx. |
| <b>Fêmeas</b> | 46  | 27,49 ±7,56 | 369,70 ±371,75 | 16   | 41,6 | 48,35 | 1242 |
| <b>Machos</b> | 65  | 27,82 ±7,05 | 352,76 ±274,09 | 14,2 | 39,5 | 36,51 | 914  |
| <b>Ind.</b>   | 198 | 12,52 ±4,27 | 30,71 ±32,70   | 3,6  | 26,5 | 0,62  | 237  |

\*Estão incluídos na tabela apenas os indivíduos em que foi obtida a identificação do sexo.

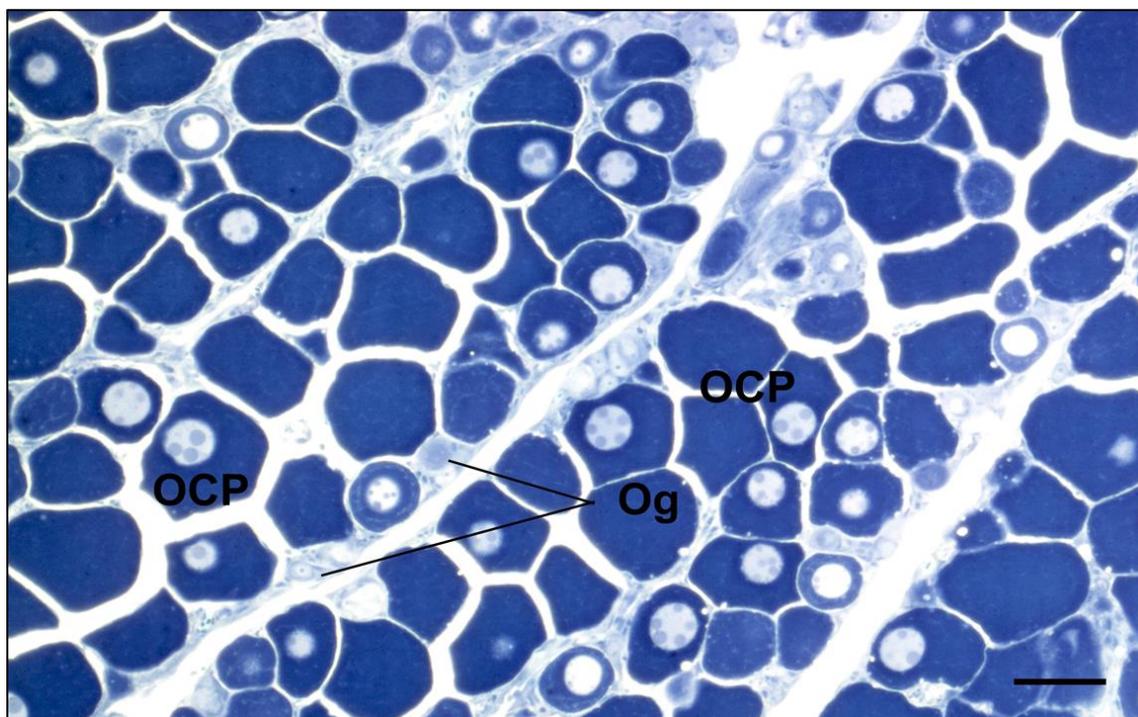
Em indivíduos indiferenciados notou-se a presença apenas de células germinativas primordiais (CGP), células somáticas (CS) e vasos sanguíneos (VS), não sendo possível determinar o sexo dos animais (Figura 1). Os machos apresentaram espermatogônias (Eg), espermatócitos primários (Et1), espermatócito secundários (Et2), espermátides (Ed) e espermatozoides (Ez) (Figura 2). As fêmeas apresentaram oogônias (og) e oócitos em crescimento primário (OCP) (Figura 3).



**Figura 1.** Fotomicrografia da gônada indiferenciada de *Brycon orbignyanus* com a presença de células germinativas, células somáticas e vasos sanguíneos. CS = células somáticas; VS = vaso sanguíneo; CGP = célula germinativa primordial. Coloração: Azul de Toluidina. Escala: 1:65  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.** Fotomicrografia do testículo de *Brycon orbignyanus* com a presença de espermatogônia (Eg), espermatócito primário (Et1), espermatócito secundário (Et2), espermátide (Ed) e espermatozoide (Ez). Coloração: Azul de Toluidina. Escala: 1:273 $\mu$ m.



**Figura 3.** Fotomicrografia do ovário de *Brycon orbignyanus* com a presença de oögonia (Og) e oócito em crescimento primário (OCP). Coloração: Azul de Toluidina. Escala: 1:273 $\mu$ m.

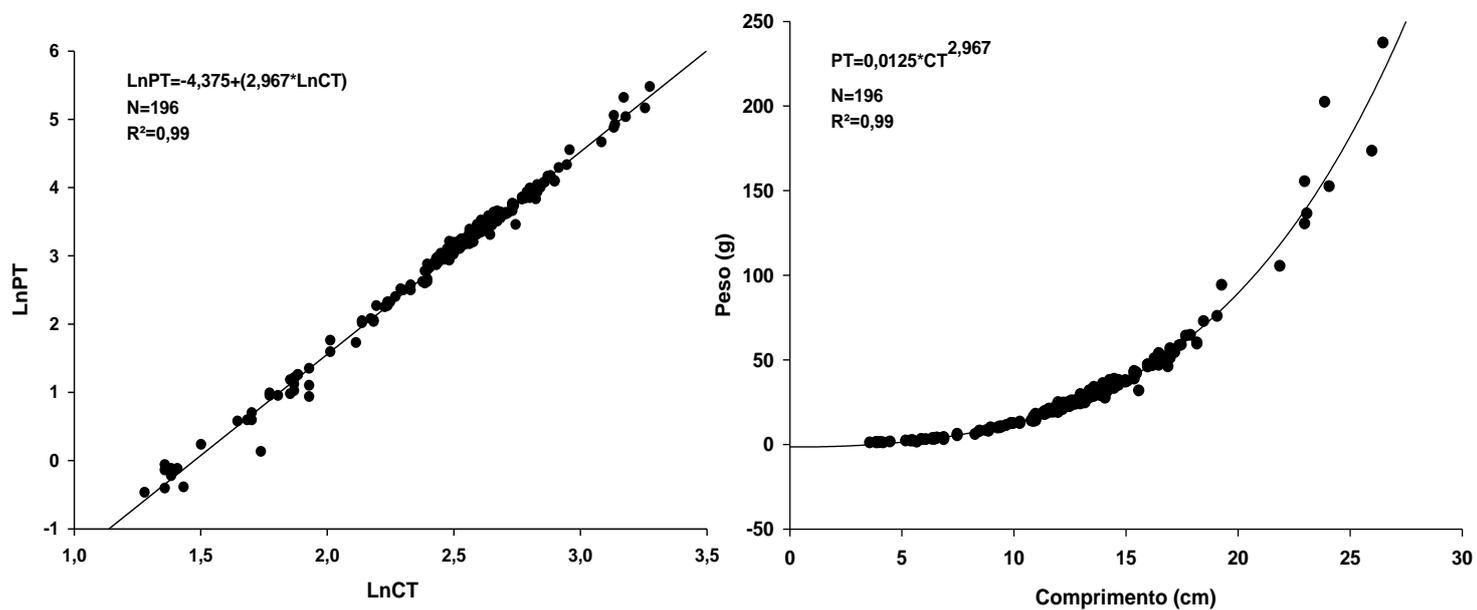
Considerando todos os indivíduos sexualmente identificados, a razão sexual foi de 1,4:1 (macho: fêmea) ( $p > 0,05$ ). A partir da aplicação da regra de Sturges (Sturges, 1926), foram estabelecidas nove classes de comprimento, as quais apresentaram flutuações na razão sexual (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados biométricos e razão sexual de piracanjubas (*Brycon orbignyanus*) nas diferentes classes de comprimento mantidas em cativeiro.

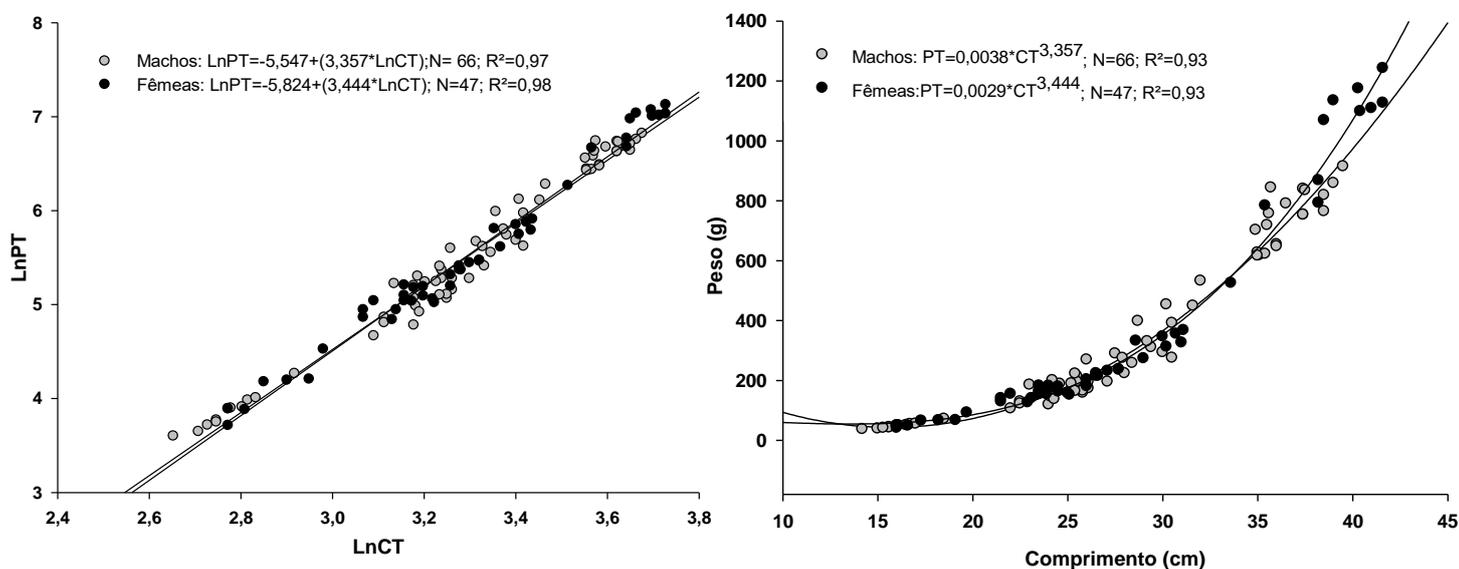
| Classes      | CT          | PT             | Ind.       | M         | F         | $\chi^2$    | Razão Sexual  | P           |
|--------------|-------------|----------------|------------|-----------|-----------|-------------|---------------|-------------|
| 1            | 5,70 ±1,16  | 2,35 ±1,28     | 30         | 0         | 0         | -           | -             | -           |
| 2            | 10,41 ±1,11 | 13,93 ±4,53    | 39         | 0         | 0         | -           | -             | -           |
| 3            | 13,59 ±1,12 | 29,86 ±6,73    | 96         | 5         | 0         | -           | -             | -           |
| 4            | 17,18 ±1,04 | 56,67 ±12,03   | 25         | 5         | 8         | 0,7         | 1:1,16        | 0,4         |
| 5            | 23,01 ±0,83 | 147,60 ±26,54  | 6          | 7         | 8         | 0,06        | 1,1:1         | 0,07        |
| 6            | 25,99 ±1,08 | 201,27 ±37,56  | 2          | 19        | 11        | 2,1         | 1,6:1         | 0,14        |
| 7            | 30,06 ±1,06 | 352,94 ±73,04  | 0          | 10        | 7         | 0,52        | 1,4:1         | 0,46        |
| 8            | 35,26 ±0,64 | 675,83 ±87,88  | 0          | 10        | 3         | 3,76        | 3,3:1         | 0,05        |
| 9            | 38,91 ±1,52 | 940,72 ±168,37 | 0          | 9         | 9         | 0           | 1:1           | 1           |
| <b>Total</b> |             |                | <b>198</b> | <b>65</b> | <b>46</b> | <b>2,92</b> | <b>1,4:1*</b> | <b>0,08</b> |

Classe 1: 3,6≤7,6 cm; classe 2: 7,7≤11,7 cm; classe 3: 11,8≤15,8 cm; classe 4: 15,9≤19,9 cm; classe 5: 20≤24 cm; classe 6: 24,1≤28,1 cm; classe 7: 28,2≤32,2 cm; classe 8: 32,3≤36,3 cm e classe 9: 36,4≤40,4 cm. CT = comprimento total (cm); PT = peso total (g); Ind. = indiferenciados; M = machos; F = fêmeas;  $\chi^2$  = Qui-Quadrado. \*Macho:Fêmea.

Em indivíduos indiferenciados, o crescimento foi isométrico ( $b=2,96$ ;  $p<0,001$ ), indicando maior crescimento em comprimento que em peso, enquanto que em machos e fêmeas a alometria foi positiva ( $b=3,35$ ;  $p<0,05$  e  $b=3,47$ ;  $p<0,05$ ), indicando maior incremento em peso que em comprimento (Figuras 4 e 5). As equações da relação peso/comprimento obtidas em animais indiferenciados e entre os sexos, os coeficientes de alometria e os coeficientes de determinação ajustados ( $R^2$ ) encontram-se nas figuras 4 e 5.



**Figura 4.** Regressão linear logarítma e relação peso-comprimento de juvenis de *Brycon orbignyianus* indiferenciados. LnPT = Logaritmo natural de peso; LnCT = logaritmo natural de comprimento; N = número amostral; PT = peso total; CT = comprimento total;  $R^2$  = coeficiente de determinação.



**Figura 5.** Regressão linear logarítma, relação peso-comprimento e sobreposição de retas em *Brycon orbignyanus* machos e fêmeas. LnPT = Logaritmo natural de peso; LnCT = logaritmo natural de comprimento; N = número amostral; PT = peso total; CT = comprimento total;  $R^2$  = coeficiente de determinação.

As alterações no fator de condição alométrico (K) foram significativas entre os sexos (Figura 6). Alterações sazonais no fator de condição também foram observadas, sendo obtido menor valor no verão ( $H=313,31$ ;  $p < 0,001$ ) em comparativo com as demais estações (Figura 7).

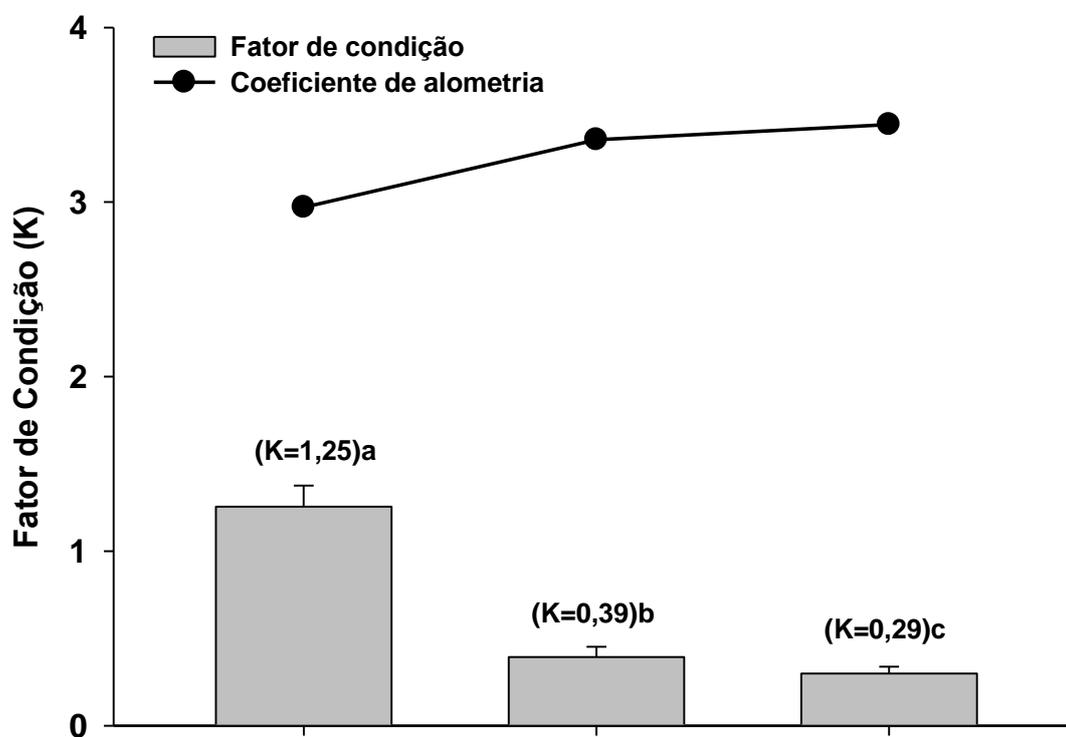
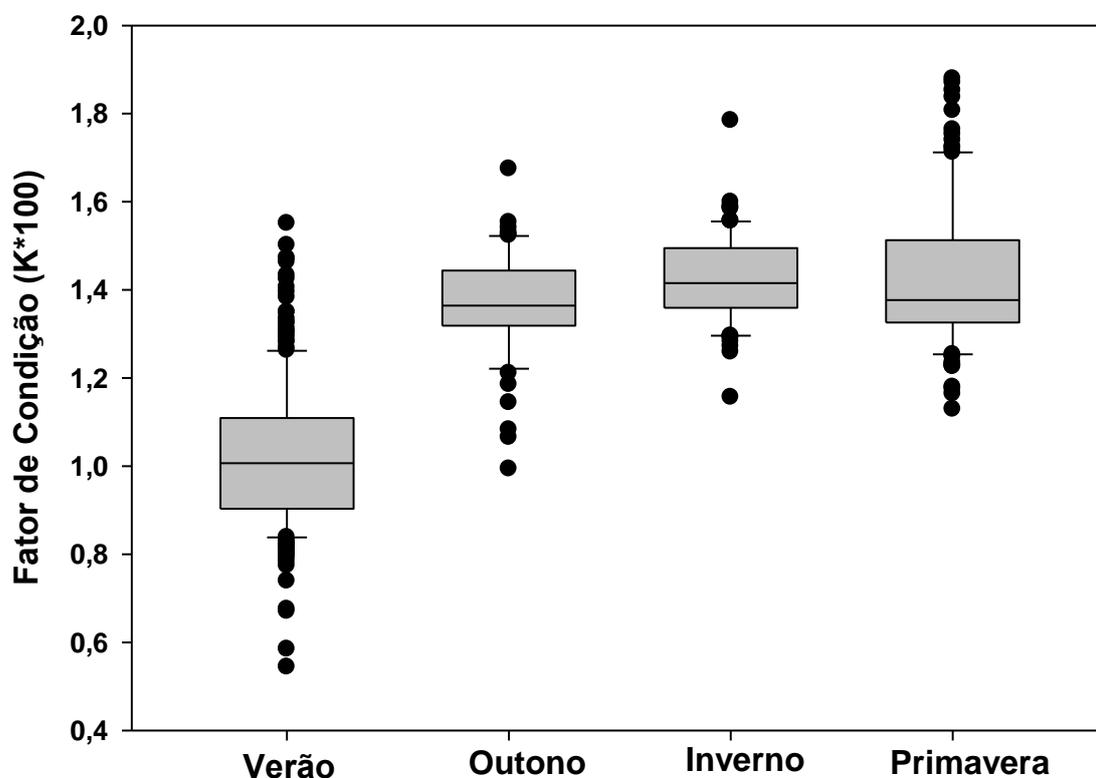


Figura 6. Alterações no fator de condição e coeficiente de alometria em *Brycon orbignyanaus* indiferenciados, machos e fêmeas mantidas em condições de cultivo. \*Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8.** Medianas e desvios interquartílicos para o fator de condição verificadas ao longo das estações do ano em *Brycon orbignyianus* mantidas em condições de cultivo.

## DISCUSSÃO

A análise sobre a desproporcionalidade de sexo em *B. orbignyianus* não comprovou estatisticamente uma razão sexual alterada, muito embora tenha sido notado uma frequência maior de machos nas classes intermediárias (6, 7 e 8), chegando a até 3,3 machos para cada fêmea na classe 8. Em ambientes naturais e ecologicamente equilibrados, a razão sexual esperada em peixes teleósteos varia de acordo com os modos reprodutivos da espécie, sendo que uma razão sexual de 1:1 é considerada uma estratégia evolutivamente estável para peixes gonocóricos (MAYNARD SMITH, 1978; WOOTTON, 1999). No entanto, variações ocorrem entre as espécies, entre populações distintas da mesma espécie em diferentes ambientes e até mesmo nas diferentes fases do desenvolvimento ontogenético (NICKOLSKY, 1978; VAZZOLER, 1996). O predomínio de machos nas classes de comprimento superiores de *Salminus brasiliensis* no Alto rio Uruguai, foi observado por MACHADO (2003), resultados semelhantes aos observados

com *B. orbignyana* no presente estudo. Em ambiente natural, GOMIERO e BRAGA (2006) encontraram variações na frequência de machos e fêmeas em *B. opalinus* na bacia do rio Paraibuna de acordo com as diferentes classes de comprimento, sendo que em classes de comprimento intermediárias (16-18cm e 18-20cm), o número de machos capturados foi o dobro que o número de fêmeas. Além disso, nas classes superiores houve a captura apenas de fêmeas, provavelmente em função do maior tamanho atingido pelas mesmas, o que interferiu na seletividade de capturas. Este fato foi observado no presente estudo, com um maior número de machos nas classes intermediárias e a mesma proporção entre machos e fêmeas na classe superior, provavelmente em função do maior tamanho e peso atingido pelas fêmeas nesta classe.

Razões sexuais desproporcionais em ambiente natural e principalmente em cativeiro por quaisquer fatores, podem acarretar perdas de variabilidade genética nas populações por efeito gargalo ou “bottleneck effect”, já que o tamanho efetivo populacional se reduz em função da queda do número de indivíduos que irão participar da reprodução (AHO, 2006.; LOPERA-BARRERO, 2007). Esta observação foi confirmada em *B. orbignyana* por LOPERA-BARRERO (2007), que testou uma razão sexual de 2:1 (macho:fêmea) e observou perda de variabilidade genética nas proles já na primeira geração. Segundo o mesmo autor, utilizar um maior número de machos em relação às fêmeas para compensar a baixa qualidade seminal nas estações de piscicultura, apesar de ser uma prática costumeira, não é a mais indicada, uma vez que leva à redução da variabilidade genética. Em se tratando de uma espécie ameaçada de extinção (ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003) e por consequência usada amplamente em programas de repovoamento, o modelo tradicional de reprodução utilizando a relação desequilibrada de sexos, levaria à perdas genéticas futuras irreversíveis de *B. orbignyana*, levando até mesmo à extinção da espécie. Assim, seria imprescindível a orientação no manejo reprodutivo de forma adequada. Além disso, as populações sexualmente desproporcionais reintroduzidas nos locais de origem através de programas de repovoamento, assim que estabelecidas serão acometidas por este efeito ao longo das gerações. Há poucos relatos na literatura sobre a dinâmica populacional e razão sexual de *B. orbignyana* em ambientes naturais, muito em função da queda nos estoques naturais observada nos últimos anos em praticamente todas as bacias de ocorrência da espécie (MACHADO *et al.*, 2005). Em cativeiro, não há estudos desta

natureza na literatura e desta forma as informações obtidas neste estudo, mesmo que em condições de cultivo, são importantes para efeito comparativo com estudos futuros.

Os parâmetros de crescimento obtidos a partir da relação peso-comprimento foram variáveis entre indivíduos indiferenciados, machos e fêmeas. O coeficiente de alometria muito próximo de 3 dos exemplares indiferenciados de *B. orbignyana*, indicam crescimento isométrico, onde as relações no formato do corpo são proporcionais e consideradas “ideais” (LECREN, 1951). Além disso, nestes animais identificou-se um melhor ajuste na equação, representado pelo elevado valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), e deste modo uma maior homogeneidade em termos morfológicos e de crescimento nesta fase do desenvolvimento. De fato, é após a diferenciação sexual e início do desenvolvimento reprodutivo que as desproporções no crescimento entre os sexos se iniciam, sendo este considerado um dos principais problemas em peixes sob condições de cativeiro (PIFERRER, 2009). Tanto nos machos quanto nas fêmeas de *B. orbignyana*, ocorreu um crescimento alométrico positivo, indicando maior incremento em peso do que em comprimento, resultados também observados em outra espécie do mesmo gênero (*B. amazonicus*) (SANTOS FILHO e BATISTA, 2009) na Amazônia Central. Já em outro estudo com a mesma espécie (*B. amazonicus*) nas porções alta e média do rio Madeira, AYALA (2013) observou crescimento alométrico negativo (2,43 e 2,41) para duas populações distintas, indicando que estes parâmetros são altamente variáveis em função dos diferentes ambientes onde residem as populações. Este fato, observado em outro estudo com uma espécie do mesmo gênero (*B. opalinus*), BRAGA (2006) observaram machos e fêmeas com crescimento alométrico positivo no rio Paraibuna e Grande, e negativo no rio Ipiranga, refletindo diferentes condições ambientais. Estas alterações no tipo de crescimento e maior incremento em peso nas fêmeas também se relaciona com a atividade reprodutiva, uma vez que nas fêmeas ocorre uma maior contribuição das gônadas no peso total, fator que muitas vezes pode levar à alterações no formato do corpo e assim alterar o coeficiente de alometria (ISAAC-NAHUM e VAZZOLER, 1983). Este fato se confirma ao observarmos que esta disparidade no incremento em peso se acentua a partir dos 35 cm, tamanho em que os animais já se encontram em fase de desenvolvimento ou aptos à desova/liberar sêmen (observação pessoal). É importante ressaltar que as variações interespecíficas observadas neste valor também refletem as diferenças nos formatos corporais encontradas entre os diferentes grupos taxonômicos, as quais são resultados das adaptações evolutivas relacionadas aos

aspectos ecológicos de cada espécie, como uso de hábitat, hábito alimentar, hábito reprodutivo entre outros (FROESE, 2006).

O fator de condição diferiu significativamente entre os três grupos analisados (indiferenciados, machos e fêmeas), sendo mais elevado entre os animais indiferenciados. Além de refletir as condições fisiológicas a partir da premissa de que animais com maior massa corporal em um dado comprimento estão em melhores condições, este índice também serve como estudo adicional dos ciclos alimentares e reprodutivos das espécies (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2002). É comum em Characiformes uma condição corporal melhor em indivíduos considerados jovens ou imaturos (LIZAMA e AMBRÓSIO, 2002). Este fato se deve ao maior acúmulo de energia e a ausência de gasto energético para atividades reprodutivas em indivíduos imaturos ou até mesmo indiferenciados (GOMIERO e BRAGA, 2006).

A tomada dos dados biométricos e a identificação sexual nos *B. orbignyana* adultos (acima de 2 anos) foram obtidas durante o período reprodutivo, onde é possível a visualização das características sexuais secundárias dos machos e fêmeas. O fato de que boa parte da obtenção dos dados foi realizada durante este período contribuiu para o menor valor do fator de condição em indivíduos já identificados como machos ou fêmeas, uma vez que se encontravam em fase de maturação gonadal. Além disso, no período de verão o fator de condição foi menor quando comparado às outras estações do ano, provavelmente em função da redução da atividade alimentar característica de espécies reofílicas durante o período reprodutivo. Esta condição observada nos *B. orbignyana* também foi observada em espécies como *Pseudoplatystoma fasciatum* (ROMAGOSA *et al.*, 2003), *B. oparlinus* (GOMIERO e BRAGA, 2006) e outras nove espécies de Characiformes (LIZAMA e AMBRÓSIO, 2002).

A dinâmica do fator de condição em ambientes naturais geralmente apresenta um comportamento semelhante em Teleósteos. Há uma redução em períodos de escassez na oferta de alimento (inverno), aumento em períodos que precedem a reprodução (primavera), declínio durante a reprodução ou imediatamente após a desova/liberação de sêmen e aumento nos períodos após a desova/liberação de sêmen (FROESE, 2006). Apesar desta dinâmica variar em função dos ritmos alimentares e reprodutivos inerentes a cada espécie, em cativeiro esta dinâmica etológica foi observada em *B. orbignyana* neste estudo, mesmo havendo intervenção nas variáveis bióticas e abióticas. Somado a estes fatores previamente mencionados, o coeficiente de alometria

variou entre 2 e 4 e também exerceu influência sobre o fator de condição, o qual foi mais elevado em indivíduos que apresentaram menor coeficiente  $b$ .

Estes estudos proveram informações básicas que podem servir como ferramentas para estudos sobre dinâmica populacional em condições semi-intensivas e comparativo com diferentes populações da espécie. Além disso, poderá direcionar pesquisas no sentido de validar metodologias para a manipulação sexual de lotes mantidos em cativeiro, já que este desequilíbrio observado pode levar à prejuízos em populações futuras.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que a razão sexual de *B. orbignyana* mostra desproporcionalidade em diferentes classes de comprimento. Os parâmetros de crescimento obtidos a partir da relação peso-comprimento variaram entre os indivíduos indiferenciados, machos e fêmeas, sendo que machos e fêmeas apresentam crescimento alométrico positivo e animais indiferenciados crescimento isométrico. O fator de condição se alterou nas diferentes fases de desenvolvimento e ao longo das estações do ano, atingindo maior valor em indivíduos indiferenciados em relação aos machos e fêmeas e menor valor durante o verão.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Energética Barra Grande S.A. (BAESA), Campo Novos Energia S.A (ENERCAN) e CNPQ pelo apoio a realização da presente pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. 2005 Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conservation Biology*, 19: 646-652.

AHO, T.; RÖNN, J.; PIIRONEN, J.; BJÖRKLUND, M. 2006 Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture*, 253: 244-248.

AYALA, D.M. 2013 Dinâmica pesqueira e estrutura populacional da jatuarana, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) comercializada nas porções alta e média da bacia do rio madeira. Rondônia. 59f (Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal de Rondônia). Disponível em

[http://www.pgdra.unir.br/downloads/Daiana\\_Ayala\\_Dissertacao\\_2001\\_2013.pdf](http://www.pgdra.unir.br/downloads/Daiana_Ayala_Dissertacao_2001_2013.pdf).

Acesso em 11 nov. 2017.

BRITO, M.F.G.; BAZZOLI, N. 2003 Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(5): 623-633.

CANTANHÊDE, G.; Castro, A.C.L.; Gubiani, É.A. 2007 Biologia reprodutiva de *Hexanemichthys proops* (Siluriformes, Ariidae) no litoral ocidental maranhense. *Iheringia, Série Zoologia*, 97: 498-504.

DOS SANTOS FILHO, L.C.; BATISTA, V.S. 2009 Dinâmica populacional da matrinxã (*Brycon amazonicus*) na Amazônia Central. *Zoologia*, 26 (2): 195-203.

ESCHMEYER, W.N.; Fong, J.D. 2014 Species by family/subfamily. URL: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em 11 nov. 2017.

FROESE, B.R. 2006 Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 241-253.

GOMIERO, J.S.G. 2005 Curvas de crescimento morfométrico e alométrico de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Minas Gerais. 36 p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras). Disponível em: [http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/2812/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Curvas%20de%20crescimento%20morfom%C3%A9trico%20e%20alom%C3%A9trico%20de%20Piracanjuba%20%28Brycon%20orbignyanus%29.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/2812/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Curvas%20de%20crescimento%20morfom%C3%A9trico%20e%20alom%C3%A9trico%20de%20Piracanjuba%20%28Brycon%20orbignyanus%29.pdf). Acesso em 13 nov. 2017.

GOMIERO, L.M.; Braga, F.M.S. 2006 Relação peso-comprimento e fator de condição de *Brycon opalinus* (Pisces, Characiformes) no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 28: 135-141.

LE-CREN, E.D. 1951 The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and conditions in the perch *Perca fluviatilis*. *Journal of Animal Ecology*, 20: 201-219.

LIMA-JUNIOR, S.E.; CARDONE, I.B.; GOITEIN, R. 2002 Determination of a method for calculation of Allometric Condition Factor of fish. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 24: 397-400.

LIMA, F.C.T. 2003 Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre. p. 330-350.

- LIZAMA, M.A.P.; Ambrósio, A.M. 1999 Relação peso-comprimento e estrutura da população de nove espécies de Characidae na planície de inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16 (3): 779 - 788.
- LOPERA-BARRERO, N.M. 2007 Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. Paraná. 92p. (Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá). Disponível em <<http://www.oceandocs.org/handle/1834/9832>>. Acesso em 13 nov. 2017.
- MACHADO, A.B.M.; MARTINS, C.S.; DRUMMOND, G.M. (eds.). 2005 *Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: Incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 160 p.
- MACHADO, C. *Aspectos Reprodutivos do Dourado Salminus brasiliensis (Cuvier, 1816) (TELEOSTEI, CHARACIDAE) na Região do Alto Rio Uruguai, Brasil*. Santa Catarina. 61p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina). Disponível em <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/86588/198909.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 13 nov. 2017.
- MAYNARD SMITH, J. 1978 *The Evolution of Sex*. Cambridge: University Press. 222p.
- NIKOLSKY, G.V. 1978 *The ecology of fishes*. 2º ed. Neptune City: T. F. H. Publications. 352p.
- ISAAC-NAHUM, V.J.; VAZZOLER, A.E.A.de M. 1983 *Biologia reprodutiva de Micropogonias furnieri (Desmarest, 1823) (Teleostei, Sciaenidae)*, 1. Fator de condição como indicador do Período de desova. *Boletim do Instituto de Oceanografia*, 32: 63-69.
- PAIVA, M.P. 1982 *Grandes Represas do Brasil*. Brasília: Editerra. 292p.
- PIFERRER, F. Determinación y diferenciación sexual en los peces. 2009 In: ESTÉVEZ, M. A. C. *La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación observatorio Español de Acuicultura, Madrid. p. 247-336.
- RAPOSO, R.M.G.; GURGEL, H.C.B. 2001 Estrutura populacional de *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1860 (Pisces, Serrasalminidae) da lagoa de Extremoz, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 23: 409-414.
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H.M.; ANDRADE-TALMELLI, E.F. 2003 Características morfométricas e crescimento do cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), em cativeiro. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 25 (2): 277-283.

- ROSS, L.G.; ROSS, B. 2008 *Anaesthetic and sedative techniques for Aquatic Animals*. 3ª ed. Oxford: Blackwell Publishing. 222p.
- SANTOS, E.P. 1978 *Dinâmica de populações aplicada à pesca e piscicultura*. São Paulo, Hucitec/Edusp. 129p.
- STURGES, H.A. 1926 The choice of a class interval. *Journal of the American Statistical Association*, 21 (153): 65-66.
- TAVARES-DIAS, M.; Araújo, C.S.O.; Gomes, A.L.S.; Andrade, S.M.S. 2010 Relação peso-comprimento e fator de condição relativo (Kn) do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) em cultivo semi-intensivo no estado do Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 12 (1): 59-65.
- TEIXEIRA DE MELLO, F.C.; IGLESIAS, A. I.; BORTHAGARAY, N.; MAZZEO, J.; VILCHES, D. LARREA; BALLABIO, R. 2006 Ontogenetic allometric coefficient changes, implications of diet shift and morphometric traits attributes in *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Characiforme, Erythrinidae). *Journal of Fish Biology*, 69: 1770-1778.
- VAZZOLER, A.E.A. de M. 1996 *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem. 169p.
- WOOTTON, R.J. 1999 *Ecology of teleost fishes*. 2ª ed. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. 386p.
- ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N.D.C. 1996 Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia*, 56: 655-659.
- ZANIBONI FILHO, E.; SCHULZ, U.H. 2003 Uruguay River. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C. & Baer, A. *Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status*. Canada, World Fisheries Trust. p. 161-194.
- ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. 2006 Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19: 233-240.

## **CAPÍTULO III\***

## **Diferenciação sexual em piracanjubas *Brycon orbignyanus* cultivadas**

É. L. ZARDO\* E D. P. STREIT JR\*.

\* Laboratório de Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil

O objetivo deste estudo foi investigar o período lábil do desenvolvimento gonadal em *Brycon orbignyanus* mantidos em condições de cultivo, e assim contribuir para a elaboração de protocolos de manipulação sexual da espécie. A partir de análise histológica, observou-se que a diferenciação gonadal (testicular ou ovariana) se inicia a partir dos 296 dias após a fertilização (DAF) e se completa em 100% dos indivíduos aos 730 DAF. Todos os indivíduos acima de 27 cm já se encontram com os órgãos reprodutores completamente formados. A estruturação dos pressupostos ovários e testículos foram semelhantes, desde a formação de cordões contínuos de células germinativas, até o isolamento gradativo das mesmas por células somáticas para a formação dos cistos de oogônias ou espermatogônias. A partir da formação dos cistos, as células germinativas entraram em meiose para a formação dos oócitos em crescimento primário e espermatócitos, momento em que também surgiram estruturas secundárias como a formação das lamelas ovígeras, túnica albugínea e epitélio germinativo. Aos 730 DAF, já foram observados machos em desenvolvimento, enquanto que neste mesmo período as fêmeas permaneceram imaturas. O período lábil se inicia antes dos 296 DAF, sendo este o momento mais indicado para a aplicação de protocolos de manipulação sexual.

Palavras-chave: determinação sexual; diferenciação ovariana; diferenciação testicular; período termossensível; proporção sexual.

## INTRODUÇÃO

A diferenciação sexual é o processo pelo qual o órgão sexual masculino ou feminino é formado a partir de um tecido rudimentar. Este processo é controlado por uma série de mecanismos moleculares e fisiológicos que se traduzem em mudanças morfológicas possíveis de se observar (Piferrer, 2009). O termo “diferenciação sexual” está diretamente relacionado com os aspectos da “determinação sexual”, termo que descreve os processos genéticos, ambientais ou a combinação deles e estabelecem um gênero (macho ou fêmea) (Bull, 1983; Devlin & Nagahama, 2002). A maioria dos teleósteos são espécies gonocóricas, condição em que existem dois sexos separadamente. Neste caso, existem dois padrões, o gonocorismo diferenciado, onde o tecido gonadal já se diferencia diretamente em ovário ou testículo e o gonocorismo indiferenciado, onde os indivíduos desenvolvem uma estrutura ovariana e posteriormente metade da população desenvolve testículos (Yamamoto, 1969; Piferrer, 2009). No entanto, existem outros mecanismos reprodutivos, entre eles os hermafroditas sincrônicos ou simultâneos, hermafroditas protândricos ou protogínicos, além de intersexualidade e unissexualidade, cujos indivíduos se reproduzem por partenogênese, gimnogênese ou hibridação (Yamamoto, 1969; Sadovy & Shapiro, 1987; Piferrer, 2009). O conhecimento das características de cada mecanismo de reprodução é fundamental para o entendimento dos processos de determinação e diferenciação sexual, além de servir também como base para o entendimento das demais características e estratégias reprodutivas.

Por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção e considerada um indicador ecológico de qualidade ambiental, a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) vem sendo muito utilizada em pesquisas relacionadas ao repovoamento (Lopera-Barrero, 2009). De acordo

com Piferrer *et al.* (2012), os principais problemas observados em peixes mantidos sob condições de cativeiro são desproporções na razão sexual, dimorfismo sexual ao longo do crescimento, ausência de maturação sexual ou problemas relacionados a qualidade de gametas. Em cativeiro, tem sido observado razões sexuais desproporcionais em lotes da espécie *B. orbignyanus*, o que configura um problema populacional importante durante o estabelecimento e propagação das populações. Além disso, a razão sexual desproporcional entre reprodutores pode levar a perdas importantes de variabilidade genética das proles com o passar do tempo por efeito gargalo ou “bottleneck effect”, uma vez que o tamanho do efetivo populacional se reduz (Aho, 2006; Lopera-Barrero, 2007).

Neste sentido, estudos histológicos a respeito dos processos de diferenciação gonadal são de extrema importância para o desenvolvimento de métodos de manipulação sexual em espécies cultivadas (Nakamura *et al.*, 1998). A eficiência na manipulação do sexo fisiológico em peixes por quaisquer fatores exógenos, como tratamento hormonal, temperatura, pH, entre outros, está diretamente relacionada com o conhecimento do período lábil no desenvolvimento gonadal, período que coincide com o início dos processos de diferenciação sexual histológica (Conover & Fleisher, 1986; Strüssmann *et al.*, 1997; Baroiller *et al.*, 1999; Goto *et al.*, 1999; Koumoundourous *et al.*, 2002; Ospina-Álvarez & Piferrer, 2008).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi definir histologicamente o período de diferenciação sexual em piracanjubas e assim descrever os principais processos relacionados à formação das gônadas. Os dados obtidos no presente estudo irão contribuir para a criação de metodologias de manipulação sexual da espécie em cativeiro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## ANIMAIS

Duzentos e quarenta indivíduos foram capturados de janeiro de 2015 a dezembro de 2016 em uma estação de piscicultura localizada no município de Paulo Lopes, Estado de Santa Catarina, Brasil. Os peixes foram mantidos em tanques escavados de 120 m<sup>2</sup> a uma densidade inicial de 50 pós-larvas/m<sup>2</sup> (a densidade final chegou a 1 peixe/m<sup>2</sup>), sendo alimentados duas vezes ao dia com ração comercial extrusada 40% PB para as pós larvas e 36% PB para os juvenis. A temperatura da água foi monitorada semanalmente ao longo de todo o período de coletas.

No primeiro ano, as coletas foram realizadas mensalmente até os animais completarem 365 dias após a fertilização (DAF). No segundo ano, foi realizada uma coleta a cada estação do ano até os animais completarem 730 DAF. Em cada amostragem, foram coletados 15 exemplares, os quais foram imediatamente insensibilizados por imersão em solução aquosa de Benzocaína (50 mg/L) (Ross & Ross, 2008) e eutanasiados por secção medular. Foram tomadas as medidas de peso (g), comprimento total e padrão (cm). O tecido gonadal de cada indivíduo foi dissecado e fixado em solução formaldeído 4% tamponado. Após 24 horas, as amostras foram transferidas para álcool 70% (Nakatani *et al.*, 2001). Indivíduos menores que 10 cm foram fixados inteiros em função da dificuldade da visualização e retirada das gônadas.

Os procedimentos de coleta foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), sob protocolo de autorização nº 23841.

## ANÁLISE HISTOLÓGICA

As gônadas foram desidratadas em séries alcoólicas (70, 80 e 95% por 24 horas cada), infiltradas e incluídas em Histo-resina Leica (Metacrilato Glicol). Secções de 3 $\mu$ m foram obtidas em um micrótomo Leica RM2245 com navalhas de vidro ou tungstênio e coradas com Azul de Toluidina. As lâminas foram fotografadas com um microscópio Nikon E200, acoplado a uma Câmera Digital CMOS com Software série 4076.

As gônadas foram caracterizadas e classificadas em três padrões morfológicos: a) gônada indiferenciada (GI) - presença de uma ou mais camadas de células somáticas (CS) e raras células germinativas primordiais (CGP) interpostas isoladamente no centro da gônada e vasos sanguíneos ausentes ou em pequena quantidade; b) diferenciação ovariana (DO) - considerada quando foi observada a transformação das células germinativas em oogônias e destas em oócitos, início do crescimento primário e início da foliculogênese; c) diferenciação testicular (DT) - onde observou-se a formação dos primeiros cistos de espermatogônias, espermátócitos primários e a formação do compartimento germinativo. Foram considerados na análise apenas os animais em início de diferenciação gonadal até a completa formação do ovário ou testículo.

Os padrões morfológicos descritos (GI, DO e DT) foram distribuídas em diferentes classes de comprimento e idades, categorizadas em dias após a fertilização (DAF). Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, considerando 5% de significância. Por não apresentarem distribuição normal ( $p < 0,05$ ), as médias de comprimento total (cm) e peso (g) foram comparadas entres os grupos através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS

As temperaturas médias registradas ao longo do período de coleta se encontram na tabela I.

TABELA I. Temperaturas médias registradas ao longo do período de coletas de *Brycon orbignyanus*.

| Estações do ano |                |                |                |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| Outono          | Inverno        | Primavera      | Verão          |
| 21 °C ±4,31     | 17,08 °C ±1,37 | 21,47 °C ±1,89 | 25,53 °C ±1,69 |

Durante todo o primeiro ano de coletas, as gônadas apresentaram-se em pares, com coloração translúcida, filiformes e percorrendo toda a cavidade celomática, desde a papila urogenital até a região da vesícula gasosa. A partir do segundo ano de coleta, as gônadas se tornaram mais esbranquiçadas, opacas e com formato mais arredondado, porém, ainda não foi possível identificar o sexo a partir apenas de visualização macroscópica.

Todos os indivíduos até os 296 DAF foram considerados GI, e os primeiros animais em processo de diferenciação gonadal foram observados aos 323 DAF (Fig. 1). Em indivíduos com mais de 675 DAF não foram observados GI, e aos 730 DAF, todos os indivíduos já estavam diferenciados em macho ou fêmea. O comprimento total (cm) e o peso (g) dos animais indiferenciados foram menores ( $H=100,391$ ;  $p<0,05$  e  $H = 101,925$ ;  $p<0,05$ , respectivamente) quando comparados aos animais já em diferenciação ovariana ou testicular (Tabela II). O peso médio das gônadas (g) e o Índice gonadossomático não diferiram entre os três grupos ( $H = 4,966$ ;  $p = 0,083$  e  $H = 5,013$ ;  $p = 0,082$ ) (Tabela II).

A frequência relativa de indivíduos indiferenciados diminuiu gradativamente nas classes de comprimento superiores (Fig. 2), sendo de 98,1% em animais menores que 15 cm. A partir de 15 cm, 40% dos indivíduos ainda se encontravam indiferenciados e não foram observados indivíduos indiferenciados maiores que 27 cm, indicando que este é o tamanho mínimo em que todos os indivíduos já completaram o processo de diferenciação sexual e formação do tecido gonadal.

TABELA II. Dados biométricos de *Brycon orbignyanus* com diferentes padrões morfológicos. GI=gônada indiferenciada; DO=diferenciação ovariana; DT=diferenciação testicular.

| Variáveis                     | GI                        | DO                         | DT                         |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Comprimento total (cm)</b> | 14,42 ±3,04 <sup>a</sup>  | 22,93 ±4,11 <sup>b</sup>   | 22,95 ±4,82 <sup>b</sup>   |
| <b>Peso (g)</b>               | 39,69 ±33,61 <sup>a</sup> | 154,83 ±79,34 <sup>b</sup> | 157,66 ±86,25 <sup>b</sup> |
| <b>Peso das gônadas (g)</b>   | 0,03 ±0,021               | 0,08 ±0,09                 | 0,14 ±0,28                 |
| <b>Índice gonadosomático</b>  | 0,018 ±0,01               | 0,04 ±0,02                 | 0,06 ±0,10                 |
| <b>Número amostral</b>        | <b>146</b>                | <b>29</b>                  | <b>35</b>                  |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05).

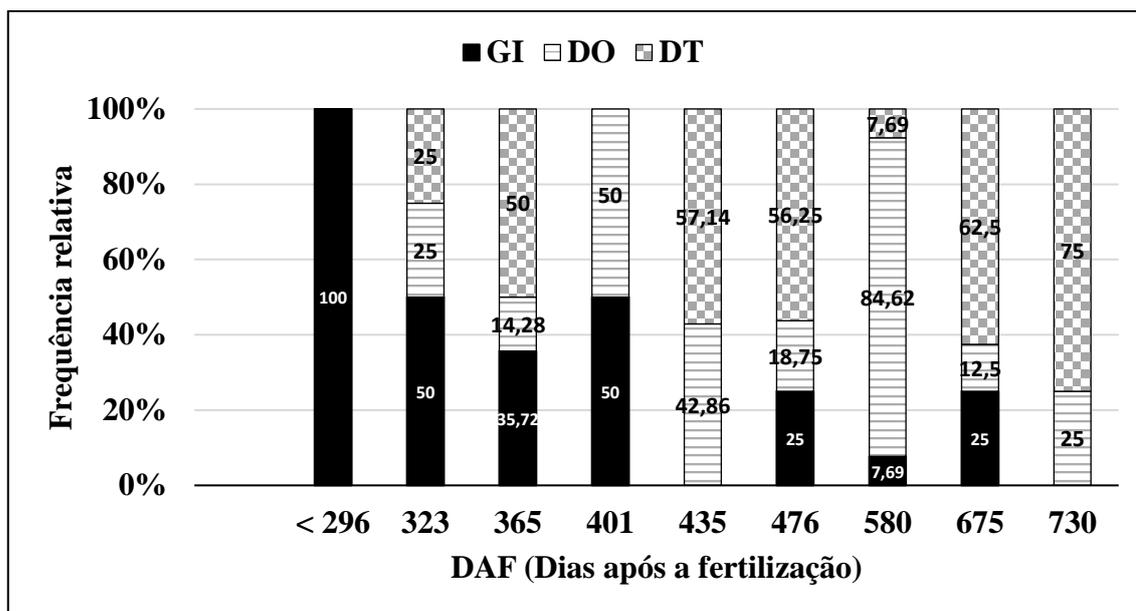


FIG. 1. Frequência relativa dos padrões morfológicos das gônadas de *Brycon orbignyanus* em relação aos dias após a fertilização (DAF). GI = gônada indiferenciada; DO = diferenciação ovariana; DT = diferenciação testicular.

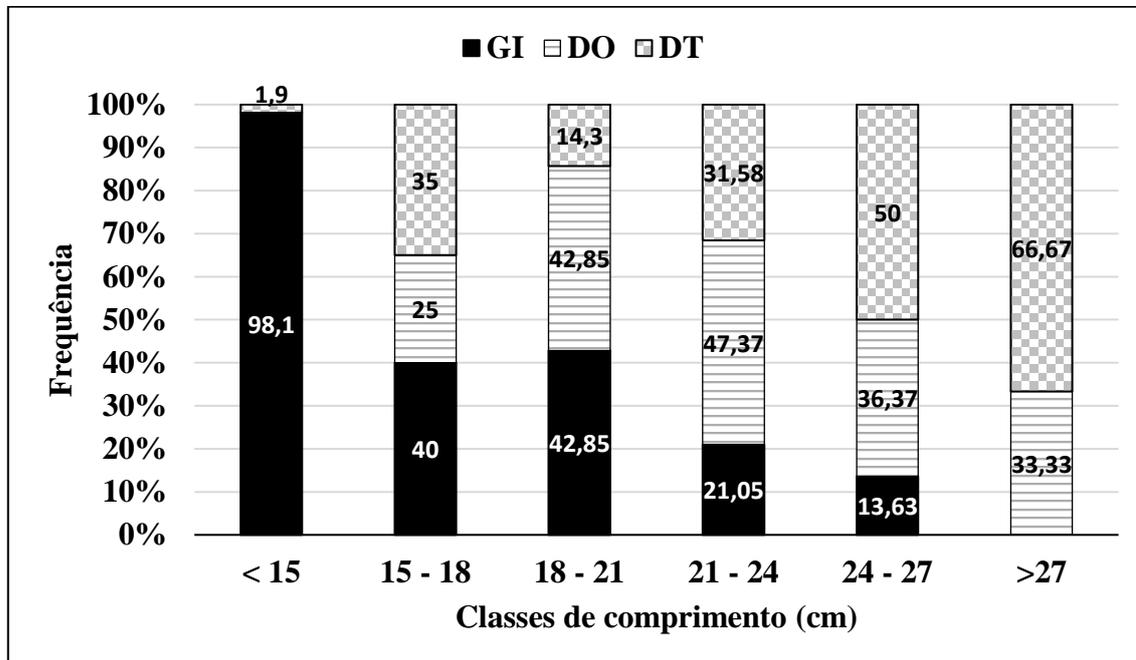


FIG. 2. Frequência relativa dos padrões morfológicos das gônadas de *Brycon orbignyanus* em relação às classes de comprimento total. GI = gônada indiferenciada; DO = diferenciação ovariana; DT = diferenciação testicular.

## GÔNADA INDIFERENCIADA

As gônadas indiferenciadas de *B. orbignyana* apresentaram componentes somáticos, células germinativas e vasos sanguíneos. Inicialmente, as células somáticas se mostraram pavimentosas e alongadas, com núcleo basófilo (coram com Azul de Toluidina) e citoplasma escasso, distribuídas por todo o tecido gonadal e interpostas por células germinativas (Fig. 3A). As CGP são ovaladas com núcleo volumoso e irregular, o qual ocupa boa parte de seu volume, apresentando em sua composição grânulos visivelmente corados com Azul de Toluidina e geralmente um único nucléolo (Fig. 3C). Em indivíduos considerados indiferenciados, as CGP inicialmente foram observadas isoladas entre as células somáticas, aumentando gradativamente em número e tamanho, passando a se organizar em cordões contínuos, alinhadas e envoltas por células somáticas (Fig. 3C). Vasos sanguíneos foram observados geralmente próximos aos cordões (Fig. 3B) e não foram observadas células somáticas no interior dos cordões.

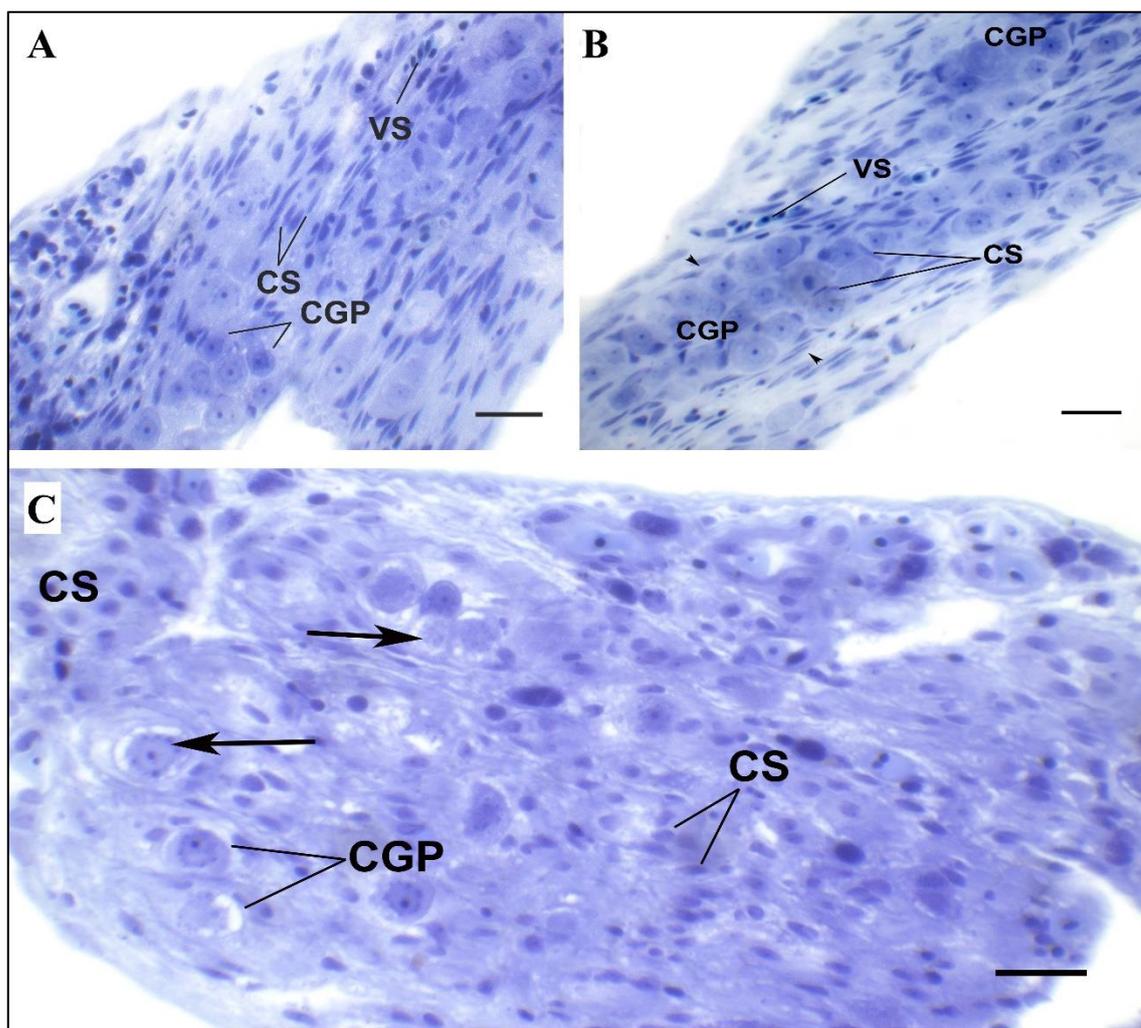


FIG. 3. Fotomicrografia da gônada indiferenciada de *Brycon orbignyanus*. A-B) Células germinativas primordiais envoltas por células somáticas e formação dos cordões contínuos de células germinativas primordiais. C) Formato arredondado e núcleo escasso das células germinativas primordiais com a presença de grânulos. CGP=células germinativas primordiais; CS=células somáticas; VS=vasos sanguíneos; seta fechada=grânulos; cabeça de seta= delimitação dos cordões contínuos. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 273  $\mu\text{m}$  (A e B) e 65 $\mu\text{m}$  (C).

#### DIFERENCIAÇÃO OVARIANA

As CGP organizadas em cordões contínuos passaram a ser isoladas por células somáticas (células pré-foliculares), formando cistos (Figs. 4A e 4B). As CGP a partir desta fase foram classificadas como oogônias (Og), apresentando formato arredondado ou irregular, citoplasma escasso com granulações que correspondem às núages, material elétron-denso presente no citoplasma, e núcleo levemente basófilo, geralmente com um nucléolo bem evidente (Figs. 4A e 4B).

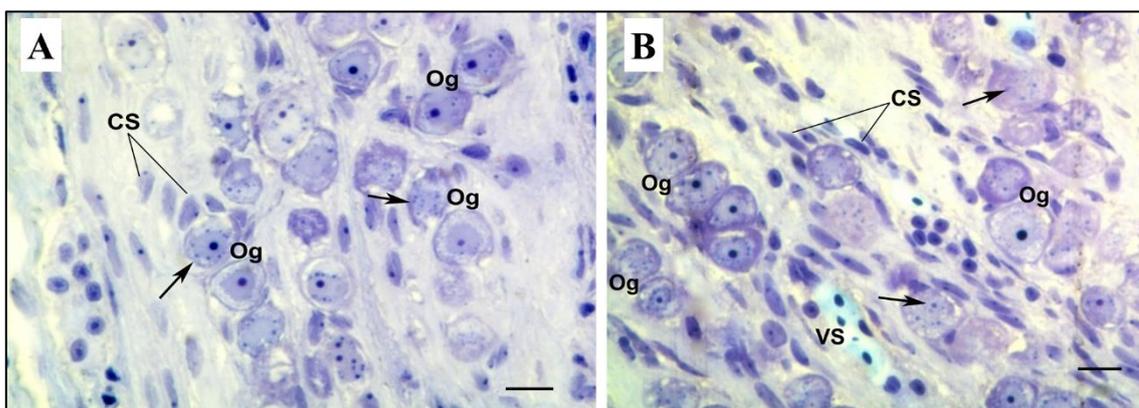


FIG. 4. Fotomicrografia da diferenciação ovariana em *Brycon orbignyianus*. A) Formação dos cistos de oogônias. B) Formação de cistos de oogônias isoladas por células somáticas. Og=oogônia; CS=célula somática; seta fechada=grânulos elétron-densos correspondentes às núages. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 273 $\mu$ m (A e B).

A figura 5 mostra a formação das oogônias em oócitos profásicos iniciais, que permanecem agrupados em cistos (Fig. 5A). Ao longo de todo o tecido gonadal, foi possível observar nesta etapa oogônias isoladas e cistos contendo oogônias e oócitos profásicos iniciais (Figs. 5A e 5B). Também foi possível observar invaginações do tecido gonadal que se projetam para a cavidade celomática e tornam-se cada vez mais profundas. Estas projeções são delimitadas por células somáticas e darão futuramente origem às lamelas ovígeras (Fig. 5A).

Os oócitos profásicos passaram a ser individualizados por células pré-foliculares, dando origem ao folículo ovariano (Figs. 5C e 5D). O oócito em crescimento primário possui um núcleo bem evidente com uma quantidade variável de nucléolos, os quais gradativamente passaram a migrar para a periferia nuclear (oócitos perinucleolares) (Figs. 5C e 5D). Os primeiros indivíduos com ovários completamente formados foram identificados somente aos 435 DAF.

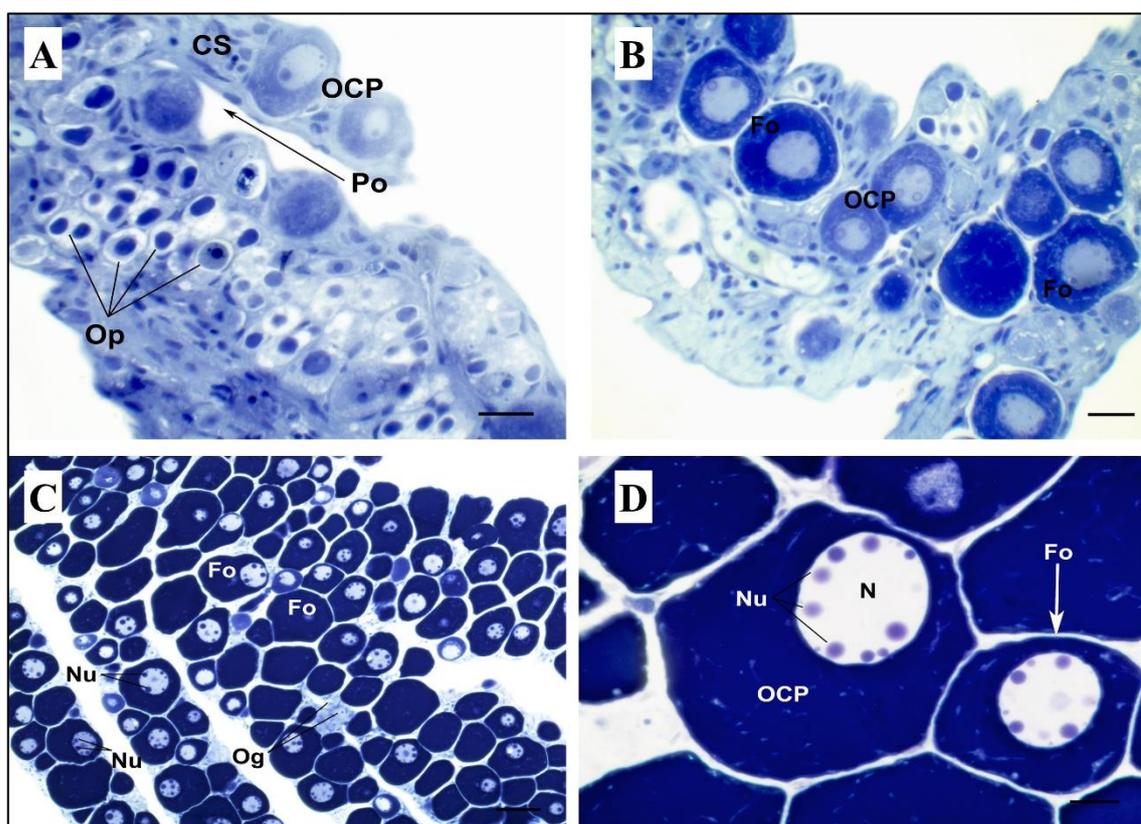


FIG. 5. Fotomicrografia da diferenciação ovariana em *Brycon orbignyanus*. A-B) Formação dos primeiros oócitos em crescimento primário e presença de oócitos profásicos iniciais. C) Formação do folículo ovariano, composto por oócitos em crescimento primário. D) Oócitos em crescimento primário com nucléolos migrando para a periferia nuclear. Og=oogônia; Op=oócito profásico; CS=célula somática; OCP=oócito em crescimento primário; Fo=folículo ovariano. Po=projeções ovarianas. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 273  $\mu$ m (A, B e C) e 65 $\mu$ m (D).

## DIFERENCIAÇÃO TESTICULAR

Em função da semelhança entre as espermatogônias iniciais e as CGP, gônadas em “diferenciação testicular” foram consideradas quando possível a identificação dos cistos de espermatócitos.

De forma semelhante ao observado durante a diferenciação ovariana, as CGP que formam os cordões contínuos ao longo de toda a gônada, passaram a ser isoladas por células somáticas (células pré-Sertoli) (CS) (Fig. 6B). As CGP, agora diferenciadas em espermatogônias (Eg) apresentaram formato arredondado, com núcleo grande, esférico e um único nucléolo bem evidente (Figs. 6A e 6B). Em seu citoplasma foi possível observar granulações provavelmente associadas à formação de organelas, as nüages (Fig. 6B). Já as células somáticas (pré-Sertoli) apresentaram núcleo basófilo, triangular e citoplasma escasso, formando projeções citoplasmáticas que se interpõem gradativamente entre as espermatogônias (Figs. 6A e 6B). Estes prolongamentos citoplasmáticos das agora células de Sertoli são responsáveis pela formação e delimitação dos cistos.

Os cistos de espermatogônias recém-formados são compostos por inúmeras células e aparentemente começam a se afastar uns dos outros, deixando pequenos espaços entre eles (Fig. 7A). Estes espaços correspondem ao compartimento luminal, o qual é delimitado por cistos de espermatogônias que formam o compartimento germinativo. Desta forma, o compartimento germinativo completamente formado é composto por espermatogônias e células de Sertoli, enquanto o compartimento intersticial formado por células somáticas em diferenciação, vasos sanguíneos e demais elementos não identificados por microscopia de luz (Fig. 7A). Após o epitélio germinativo completamente formado, a espermatogênese de fato iniciou de forma sincrônica dentro

de cada cisto (Fig. 7B). Os primeiros indivíduos com testículo completamente formado foram observados aos 435 DAF.

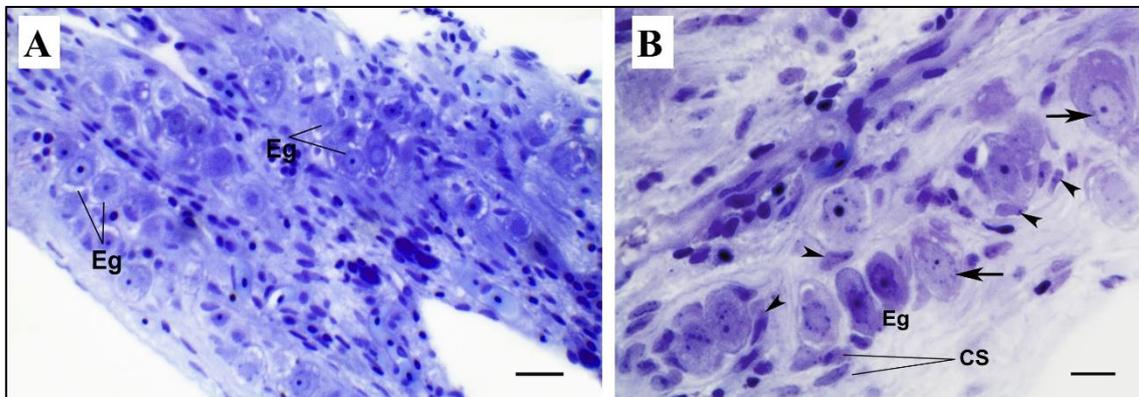


FIG. 6. Fotomicrografia da diferenciação testicular em *Brycon orbignyanus*. A-B) Células somáticas (pré-Sertoli) invadindo e isolando gradativamente as espermatogônias. Detalhe do formato arredondado, núcleo evidente e um único nucléolo das espermatogônias, com a presença de granulações associadas às núages no citoplasma e projeções citoplasmáticas das células somáticas (pré-Sertoli) interpondo-se às espermatogônias. Eg=espermatogônia; CS=célula somática; Et=espermatócito; VS=vaso sanguíneo; seta fechada=granulações; cabeça de seta=projeções citoplasmáticas das células somáticas. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 273 $\mu$ m (A) e 65 $\mu$ m (B).

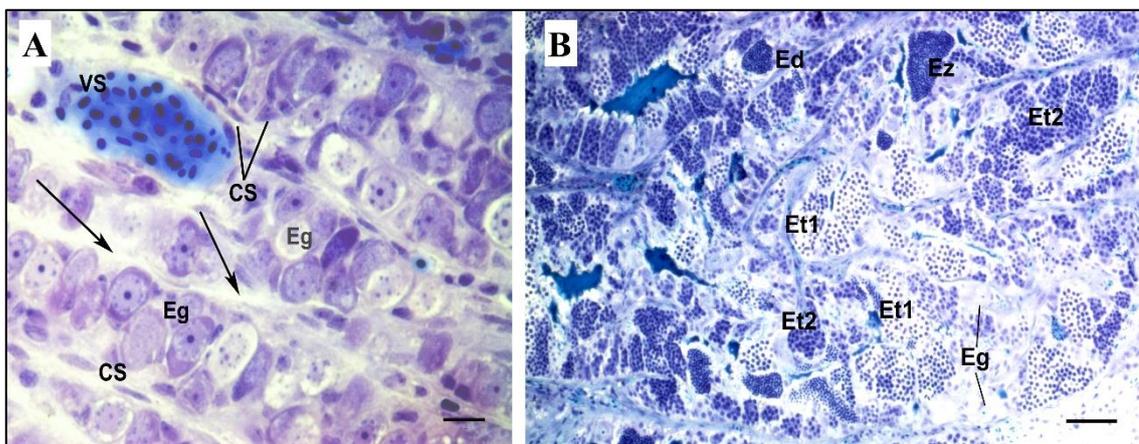


FIG. 7. Fotomicrografia da diferenciação testicular em *Brycon orbignyana*. A-B) Cistos formados e compostos por uma grande quantidade de espermatogônias e espermatogênese ativa. Notar os espaços entre os cistos, formando o compartimento luminal e a presença de vasos sanguíneos próximos ao compartimento germinativo. Eg=espermatogônia; CS=célula somática; VS=vaso sanguíneo; Eg=espermatogônia; Et1=espermátócito primário; Et2=espermátócito secundário; Ed=espermátide; Ez=espermatozoide; Seta fechada=compartimento luminal. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 65 $\mu$ m (A) e 273 $\mu$ m (B).

## DISCUSSÃO

Em peixes Teleósteos, as células germinativas primordiais migram a partir de regiões extragonadais para a crista gonadal, onde se formará o primórdio gonadal iniciando assim a diferenciação de um órgão reprodutor masculino ou feminino (Braat *et al.*, 1999). Em espécies gonocóricas diferenciadas, o desenvolvimento gonadal inicial procede de uma gônada indiferenciada e esta se transforma diretamente em ovário ou testículo, padrão observado no presente estudo. A ausência de indivíduos intersexo confirmou este fato, uma vez que a presença marcante de indivíduos intersexo ocorre em

espécies gonocorísticas indiferenciadas, onde há inicialmente o desenvolvimento de tecido ovariano, seguido de degeneração e formação de estrutura testicular em aproximadamente metade da população (Uchida *et al.*, 2002; Devlin & Nagahama, 2002; Piferrer, 2009).

No presente estudo não foram observadas alterações significativas nos padrões morfológicos das gônadas antes dos 296 DAF, sendo que anterior a este período foram verificadas apenas células somáticas e raras células germinativas, com a presença ou não de vasos sanguíneos em pequena quantidade. Esta reorganização celular e início do processo de diferenciação gonadal em *B. orbignyana* é mais tardio quando comparado à maioria dos Teleósteos estudados. No entanto, ao se avaliar o período de diferenciação gonadal devemos levar em consideração a temperatura em que a população se encontra, uma vez que este processo provavelmente sofre forte influência da temperatura e outros aspectos biológicos inerentes à espécie, como tamanho e idade a primeira maturação.

É consenso entre os autores que em peixes Teleósteos a diferenciação ovariana se inicia antes da diferenciação testicular (Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Mazzoni *et al.*, 2010; Mazzoni, 2013; Pan *et al.*, 2017). Em dois estudos realizados com peixes reofílicos neotropicais (*Piaractus mesopotamicus* e *Leporinus friderici*), observou-se que a formação dos ovários iniciou aos 150 DAF nas duas espécies (Barbosa, 2015; Souza, 2015). Apesar de não ter ficado claro que a diferenciação ovariana ocorreu antes da testicular em *B. orbignyana*, esta possibilidade não foi descartada, uma vez que o percentual de indivíduos em diferenciação testicular e ovariana foi o mesmo aos 323 DAF. Além disso, na coleta seguinte, aos 365 DAF, o percentual de indivíduos em diferenciação testicular aumentou, sugerindo que uma porcentagem dos animais indiferenciados aos 323 DAF possivelmente iriam desenvolver testículos mais tarde.

A estruturação gonadal de *B. orbignyana* em relação aos componentes somáticos e germinativos foram semelhantes ao observado em outros Teleósteos, onde inicialmente são observadas poucas células germinativas dispostas entre as células somáticas na região mais central do tecido. Após o processo de migração das CGP para a crista gonadal é que se inicia efetivamente a formação do primórdio gonadal. Nesta etapa as células germinativas estão isoladas, envoltas por células somáticas e inicia-se o processo de mitose, garantindo a auto renovação celular (Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Mazzoni, 2009; Nakamura, 2013; Pan *et al.*, 2017). Apesar de a atividade mitótica estar frequentemente documentada na etapa de formação do primórdio gonadal, no presente estudo não foi identificada, assim como reportado por Nakamura *et al.* (2013) em *Salvelinus leocommaenis*. Com isso, é possível sugerir que a proliferação de células somáticas ocorre antes e de maneira muito mais rápida em comparação às células germinativas, o que caracteriza o formato alongado e o aparente isolamento das células germinativas ao longo do tecido (Van Winkoop *et al.*, 1992; Strüssman *et al.*, 1996; Mazzoni *et al.*, 2009). De acordo com Devlin & Nagahama (2002), o primórdio gonadal passa por um período com baixo crescimento somático e sem diferenciação histológica ou atividade germinativa aparente, o que pode durar dias, meses ou até mesmo anos, dependendo da espécie (Strüssmann & Nakamura, 2002). Este fato explica a dificuldade em estabelecer precocemente o sexo dos indivíduos a partir de microscopia de luz, como também foi observado no presente estudo. Desta forma, é possível afirmar que está ocorrendo diferenciação ovariana ou testicular, apenas a partir da observação de células germinativas em estágios mais avançados da gametogênese.

Em função da semelhança entre as CGP e as oogônias ou espermatogônias em análise a partir de microscopia de luz, só foi possível identificar o sexo dos indivíduos

com segurança a partir da observação de outras características. Dentre estas, o aumento significativo no número de CGP, associado a uma reorganização das mesmas e a entrada destas células em meiose foram os critérios utilizados para a identificação dos tecidos em diferenciação. Estes critérios, juntamente com o aparecimento de vasos sanguíneos, formação da cavidade ovariana ou ducto espermático também foram citados por Lubzens *et al.* (2010) e Nakamura *et al.* (2013). De acordo com Mazzoni (2009), apenas a reorganização celular e formação dos cordões contínuos não oferecem nenhum indício quanto ao rumo da diferenciação sexual. A formação dos cordões contínuos foi observada tanto em futuros ovários como em futuros testículos em *B. orbignyana*, não sendo observada uma relação direta entre este evento e o direcionamento da diferenciação gonadal. No entanto, pode-se afirmar que esta reorganização precede o início da meiose e formação de ninhos de oogônias ou cistos de espermatócitos. No caso da diferenciação ovariana, a entrada das oogônias em meiose marca o aparecimento de oócitos profásicos iniciais, que passam a ser novamente isolados pelas agora células foliculares para a formação do complexo folicular, composto pelo oócito em crescimento primário e as células foliculares (Lubzens *et al.*, 2010). Já na diferenciação testicular, a entrada em meiose marca a formação dos espermatócitos primários, processo morfológico mais difícil de se identificar por microscopia de luz, uma vez que as células germinativas destinadas à formação de espermatozoides permanecem quiescentes por um período mais longo (Nakamura *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2010).

Apesar do período quiescente mais longo observado nas células germinativas masculinas, foi possível observar que em *B. orbignyana* os machos entram no ciclo reprodutivo mais rapidamente que as fêmeas. Este fato é comprovado pela presença de machos já em desenvolvimento aos 730 DAF, enquanto as fêmeas permaneceram na fase

imatura, seguindo a classificação recomendada por Brown-Peterson *et al.* (2011). Esta característica também foi observada por Barbosa (2015) em *P. mesopotamicus*, sugerindo que apesar da diferenciação ovariana preceder a testicular, os machos se tornam aptos à reprodução mais cedo que as fêmeas.

Período lábil é considerado um período crítico da determinação sexual em que se iniciam mudanças estruturais em nível celular, controladas por fatores genéticos, fisiológicos e hormonais (Fernandino *et al.*, 2008). Estas mudanças são desencadeadas por fatores ambientais como temperatura, pH, condições de cultivo e são possíveis de identificar histologicamente (Baroiller *et al.*, 1999; Azuma *et al.*, 2004). A partir da descrição histológica realizada ao longo do desenvolvimento de *B. orbignyana* no presente estudo, os processos celulares da diferenciação sexual se iniciam a partir dos 296 DAF e se completam em todos os indivíduos aos 730 DAF. Desta forma, o período lábil identificado para *B. orbignyana* no presente estudo e nas condições climáticas em que o mesmo foi desenvolvido se inicia antes dos 296 DAF, período em que as gônadas indiferenciadas apresentam maior capacidade de resposta aos métodos de manipulação sexual. Estas informações são importantes para o conhecimento dos processos de diferenciação sexual e direcionar a elaboração de protocolos de manipulação sexual.

Agradecemos à Energética Barra Grande S.A. (BAESA), Campos Novos Energia S.A. (ENERCAN) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azzuma, T., Takeda, K., Doi, T., Muto, K., Akutsu, M., Sawada, M., Adachi, S. (2004). The influence of temperature on sex determination in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Aquaculture*, **234**, 461-473.
- Barbosa, R.P. (2015). Diferenciação gonadal em *Piaractus mesopotamicus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/131955>.
- Baroiller, J. F., Guiguen, Y. & Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Molecular Life Science* **55**, 910-931.
- Braat, A. K, Speksnijder, J. E. & Zivkovic, D. (1999). Germ line development in fishes. *International Journal of Development Biology* **43**, 745–760.
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J. & Susan K. Lowerre-Barbieri, S. K. A. (2011). Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science* **3**, 52-70.
- Bull, J. J. (1983) Evolution of sex determining mechanisms. Menlo Park: Benjamin/Cummings. 316 p.
- Conover, D. O. & Fleisher, M. H. (1986). Temperature-sensitive period of sex determination in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **43**, 514-520.
- Devlin, R. H. & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**, 191-364.

- Fernandino, J. I., Hattori, R. S., Shinoda, T. K. H, Strobl-Mazzula, P. H., Strussmann, C. A., Somoza, G. M. (2008). Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Sexual Development* **2**, 316-324.
- Goto, R., Mori, T., Kawamata, K., Matsubara, T., Mizuno, S. & Yamauchi, K. (1999). Effects of temperature on gonadal sex determination in barfin flounder *Verasper moseri*. *Fisheries Sciences* **65**, 884-887.
- Koumoundourous, G., Pavlidis, M., Anezaki, L., Kokkari, C., Sterioti, A., Divanach, P. & Kentouri, M. (2002). Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. *Journal of Experimental Zoology* **292**, 573–579.
- Lopera-Barrero, N. M. (2002). Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. *Ciência e Investigación Agraria*, Santiago 36, 191-208.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 367–389.
- Mazzoni, S.T. (2009). Formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal em *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cypriniformes): análise estrutural e ultraestrutural das células germinativas e somáticas. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/317605>.
- Mazzoni, S. T., Grier, H. J. & Quagio-Grassiotto, Irani. (2010). Germline Cysts and the Formation of the Germinal Epithelium During the Female Gonadal Morphogenesis in

*Cyprinus Carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *The Anatomical Record* **293**, 1581–1606.

Mazzoni, S.T. (2013). Formação do epitélio germinativo e diferenciação das estruturas gonadais: uma análise comparativa entre os grupos mais basais (Ostariophysi) e mais derivados (Atherinomorpha e Percomorpha) dentro de Teleostei. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Meijide, F. J., Lo Nostro, F. L. & Guerrero, G. A. (2005). Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light- and Electron-Microscopic Study. *Journal Of Morphology* **264**, 191–210.

Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T. & Nagahama, Y. (1998). Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish. *The Journal of Experimental Zoology* **281**, 362–372.

Nakamura, M. (2013). Morphological and Physiological Studies on Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish. *Aqua-BioScience Monographs* **6**, 1–47.

Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C. & Pavanelli, C. S. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá, PR: Eduem.

Ospina-Álvarez, N. & Piferrer, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited. Prevalence, existence of a single sex ratio response pattern and possible effects of climate change. *PLoS One* **3**, n. 7, e2837. doi:10.1371/journal.pone.0002837.

Pan, Z. J., Zhu, C. K., Wang, H., Zhou, F. J. & Qiang, X. G. (2017). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in cultured Ussuri catfish *Tachysurus ussuriensis*. *Journal of Fish Biology* **91**, 866–879.

- Piferrer, F., Ribas, L. & Díaz, N. (2012). Genomic approaches to study genetic and environmental influences on fish sex determination and differentiation. *Marine Biotechnology* **14**, 591–604.
- Piferrer, F. (2009). Determinación y diferenciación sexual en los peces. In *La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (Estévez, M. A. C., ed),. Pp. 247-336. Madrid: Publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación observatorio Español de Acuicultura, 2009.
- Ross, L. G. & Ross, B. (2008). *Anaesthetic and sedative techniques for Aquatic Animals*. 3rd edn. Oxford: UK: Blackwell Publishing.
- Sadovy, Y. & Shapiro, D. Y. (1987). Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia* **1987**, 136-156.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 390–411.
- Souza, T.G. (2015). Desempenho reprodutivo e diferenciação gonadal de piau-três-pintas, *Leporinus friderici*, Bloch 1974. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- Strüssmann, C. A., Takashima, F., Toda, K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* **139**, 31-45.
- Strüssmann, C. A., Saito, T., Usui, M., Yamada, H. & Takashima, F. (1997). Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two Atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *The Journal of Experimental Zoology* **278**, 167–177.

- Strüssmann, C. A. & Nakamura, M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 13-29.
- Uchida, D. M., Yamashita, T., Kitano & Iguchi, Y. T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *Journal of Experimental Biology* **205**, 711-718.
- Valenzuela, N., Adams, D. C. & Janzen, F. J. (2003). Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? *The American Naturalist* **161**, 676-683.
- Van Winkoop, A., Booms, G. H. R., Dulos, G. J. & Timmermans, L. P. M. (1992). Ultrastructural changes in primordial germ cells during early gonadal development of the common carp (*Cyprinus carpio* L., Teleostei). *Cell & Tissue Research* **267**, 337-346.
- Yamamoto, T. (1969). Sex differentiation. In *Fish Physiology*. (Hoar, W. & Randall, D., eds), pp. 117-175. London: UK: Academic Press.

## **CAPÍTULO IV\***

**Espermatogênese e ciclo reprodutivo de *Brycon orbignyanus* mantidos em condições de cultivo**

*Ciclo reprodutivo de *Brycon orbignyanus* cultivados*

**Éverton Luís Zardo<sup>1</sup>; Danilo Pedro Streit Jr<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil

**Agradecimentos**

Agradecemos à Energética Barra Grande S.A. (BAESA), Campos Novos Energia S.A. (ENERCAN) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

**Resumo**

Por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção, *Brycon orbignyanus* vem sendo cultivada para o uso em programas de repovoamento visando a recuperação dos estoques em seus locais de origem. Desta forma, o conhecimento dos aspectos relacionados à reprodução em ambientes de cultivo é de extrema importância para o sucesso na produção de larvas e alevinos de qualidade visando a conservação da espécie. O objetivo do presente estudo foi caracterizar e descrever a espermatogênese e as fases reprodutivas vivenciadas por indivíduos machos mantidos em condições de cultivo e assim elucidar uma escala de maturação para a espécie. Para tal, foram realizadas coletas mensais e trimestrais de juvenis e adultos de *B. orbignyanus* em uma estação de piscicultura comercial. Os animais foram insensibilizados em solução aquosa de Benzocaína e eutanasiados para a coleta dos testículos, os quais foram fixados em solução formaldeído tamponado 4% para análise histológica. As fases do ciclo reprodutivo foram estabelecidas a partir da observação das características macro e microscópicas dos testículos, sendo determinadas a partir da distribuição das células espermatogênicas ao longo do tecido gonadal e nas variações no Índice Gonadosomático. Foram identificadas e descritas cinco fases reprodutivas de *B. orbignyanus* em condições de cativeiro, sendo elas:

imaturidade, desenvolvimento inicial, desenvolvimento, apto a liberação de esperma e regressão. Os machos de *B. orbignyana* tornam-se aptos à reprodução quando atingem 435 dias após a fertilização (DAF), no entanto alguns indivíduos tornam-se maduros (desenvolvimento) já aos 365 DAF. Este fato mostra a alta variação individual observada para esta espécie, uma vez que aos 435 DAF já são encontrados indivíduos aptos a liberação de esperma e aos 730 DAF ainda são observados indivíduos em desenvolvimento inicial. O IGS, índice biológico bastante utilizado para aferir sobre os ciclos reprodutivos foi mais elevado nas fases reprodutivas mais avançadas, as quais foram observadas na primavera e verão.

## 1. INTRODUÇÃO

A morfologia gonadal tanto em nível anatômico quanto histológico, vem sendo estudada em peixes há muito tempo com o intuito de identificar o início da maturidade sexual, o ciclo reprodutivo, a fecundidade e os ritmos de desova ou liberação de sêmen (Parenti & Grier, 2004). Estudos histológicos detalhados, juntamente com a avaliação de índices biológicos como o índice gonadossomático, são comumente utilizados para determinar o ciclo anual em peixes (Vazzoler, 1996; Grier & Taylor, 1998). Os ciclos reprodutivos podem ser determinados a partir da avaliação de um conjunto de características morfológicas das gônadas, das células germinativas de cada linhagem gametogênica e da distribuição destas células ao longo do tecido gonadal (Veloso-Júnior et al., 2009). Estas características variam de acordo com as diferentes épocas do ano e estratégias reprodutivas de cada espécie, sendo traduzidas em diferentes fases reprodutivas, as quais representam a descrição dos eventos cíclicos necessários para a produção e liberação de gametas viáveis (Brown-Peterson et al., 2011).

Estudos relacionados à biologia reprodutiva de peixes de água doce neotropicais se detém principalmente na descrição da gametogênese e avaliação do ciclo reprodutivo em ambientes naturais (Cruz-Landim et al., 2003; Gonçalves et al., 2006; Veloso-Júnior et al., 2009; Martins et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Muñoz et al., 2011; Freitas et al., 2013; Siqueira-Silva et al., 2013; Vanin et al., 2017). Estes estudos são geralmente descritivos e/ou comparativos e relacionam as características reprodutivas com variáveis bióticas e abióticas, portanto, apresentando viés ecológico. Estudos neste sentido, em ambientes de cultivo, são escassos em função da dificuldade em se obter um número

amostral consistente de exemplares em todas as fases de desenvolvimento e épocas do ano, além de o ciclo reprodutivo ser incompleto em grande parte dos peixes cultivados (Mylonas et al., 2010).

A espécie em estudo (*Brycon orbignyanus*), é uma espécie neotropical reofílica pertencente à família Bryconidae (Eschmeyer & Fong, 2014), com ocorrência natural nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Lima, 2003). Em função da queda dos estoques naturais por intervenções humanas, na bacia do rio Uruguai a espécie atualmente se encontra ameaçada de extinção, apresentando registros raros e restritos às proximidades do Parque Estadual do Turvo (Machado et al., 2005; Zaniboni-Filho & Schulz, 2003). Por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção, *B. orbignyanus* vem sendo amplamente utilizada em programas de repovoamento, os quais visam reestabelecer populações nos locais de origem e garantir os estoques genéticos futuros da espécie (Lopera-Barrero, 2009; Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Panarari-Antunes et al., 2011). Estas medidas, embora controversas, são citadas como uma ferramenta eficiente para a conservação de espécies com elevado grau de ameaça, onde as populações naturais já estão praticamente extintas e os efeitos da perda de variabilidade genética são irreversíveis. No entanto, o sucesso desses programas invariavelmente passa pelo completo entendimento dos aspectos biológicos e zootécnicos da espécie, e o domínio destes é fundamental para a correta aplicação do manejo reprodutivo e garantia das proles futuras.

Com base no exposto, o presente estudo tem como objetivo descrever a espermatogênese e o ciclo reprodutivo de machos de *B. orbignyanus* mantidos em condições de cultivo, a fim de criar uma escala de maturação para espécie.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local e Animais**

Os animais foram coletados em uma estação de Piscicultura comercial localizada no município de Paulo Lopes, Estado de Santa Catarina durante os anos de 2015 e 2016. Foram realizadas coletas mensais e trimestrais (sazonais) no primeiro e segundo anos de estudo respectivamente, sendo capturados 15 exemplares por amostragem. As coletas abrangeram animais de 21 dias após a fertilização (DAF) até 4 anos de idade (1460 DAF). Foram considerados para a análise histológica, apenas os animais a partir dos 323 DAF,

idade em já foi possível identificar o sexo dos mesmos. Após a captura, os exemplares foram insensibilizados por imersão em solução aquosa de Benzocaína (50 mg/L) (Ross & Ross, 2008) e eutanasiados por secção medular. Os procedimentos de coleta foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), sob protocolo de autorização nº 23841. Foram tomadas as medidas de peso (g) e comprimento total (cm). Posteriormente, foi realizada dissecação para a retirada dos testículos, os quais foram fixados em solução formaldeído 4% tamponado por 24 horas e armazenados em álcool 70°GL (Nakatani *et al.*, 2001).

## **2.2.Histologia**

Os testículos foram desidratados em séries alcoólicas (70, 80 e 95°GL por 24 horas cada), infiltrados e incluídos em Historessina Leica (Metacrilato Glicol). Secções de 3µm foram obtidas em um micrótomo Leica RM2245 com navalhas de vidro e tungstênio e coradas com corante Azul de Toluidina. As lâminas foram observadas usando microscopia de luz, sob aumentos de 100x e 400x. As secções foram fotografadas com um microscópio Nikon E200, acoplado a uma Câmera Digital CMOS com Software série 4076.

## **2.3.Ciclo reprodutivo**

As fases do ciclo reprodutivo foram estabelecidas a partir da observação das características macro e microscópicas dos testículos. As mesmas foram determinadas a partir da análise da presença e distribuição das células espermatogênicas ao longo do tecido gonadal e variações no Índice Gonadossomático, seguindo a escala de maturação gonadal proposta por Brown-Peterson *et al.* (2011). As características morfológicas das células espermatogênicas em cada linhagem germinativa foram adaptadas de Bazzoli (2003) e Schulz (2010). O Índice Gonadossomático (IGS) foi calculado a partir da relação entre o peso da gônada e o peso total, seguindo a seguinte fórmula (Vazzoler, 1996):  $IGS = \left(\frac{Pg}{Pt}\right) * 100$ , onde: Pg=peso da gônada (g) e Pt=peso total (g).

O diâmetro médio de aproximadamente 100 células de cada estágio espermatogênico foi mensurado utilizando o Software Image-ProPlus. As células utilizadas para a tomada desta medida foram selecionadas levando em consideração a sua

integridade (ausência de retração e núcleo bem evidente e centralizado) (Veloso-Júnior et al., 2009).

### 3. RESULTADOS

Foram analisados histologicamente 44 exemplares com comprimento total variando entre 14,2 e 42,22 cm e peso variando entre 49,20 e 1130,00 g (Tabela 1).

**Tabela 1.** Dados biométricos de *Brycon orbignyanus* em condições de cultivo nas diferentes fases reprodutivas. CT = comprimento total (cm); Mín.: mínimo; Máx.: máximo; PT = peso total (g).

|             | Imaturo      | Desenvolvimento inicial | Desenvolvimento | Apto a liberar esperma | Regressão      |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------------|------------------------|----------------|
| <b>CT</b>   | 19,63 ±5,60  | 20,45 ±4,35             | 25,85 ±2,92     | 26,1 ±2,91             | 39,12 ±2,69    |
| <b>Mín.</b> | 16,1         | 14,2                    | 16,7            | 22,5                   | 37,25          |
| <b>Máx.</b> | 26,1         | 28,4                    | 30,5            | 30                     | 42,22          |
| <b>PT</b>   | 91,88 ±70,27 | 112,14 ±69,01           | 194,58 ±62,31   | 219,67 ±66,40          | 927,66 ±176,53 |
| <b>Mín.</b> | 49,2         | 36,51                   | 53,46           | 129                    | 805            |
| <b>Máx.</b> | 173          | 257,52                  | 284,83          | 293,3                  | 1130           |

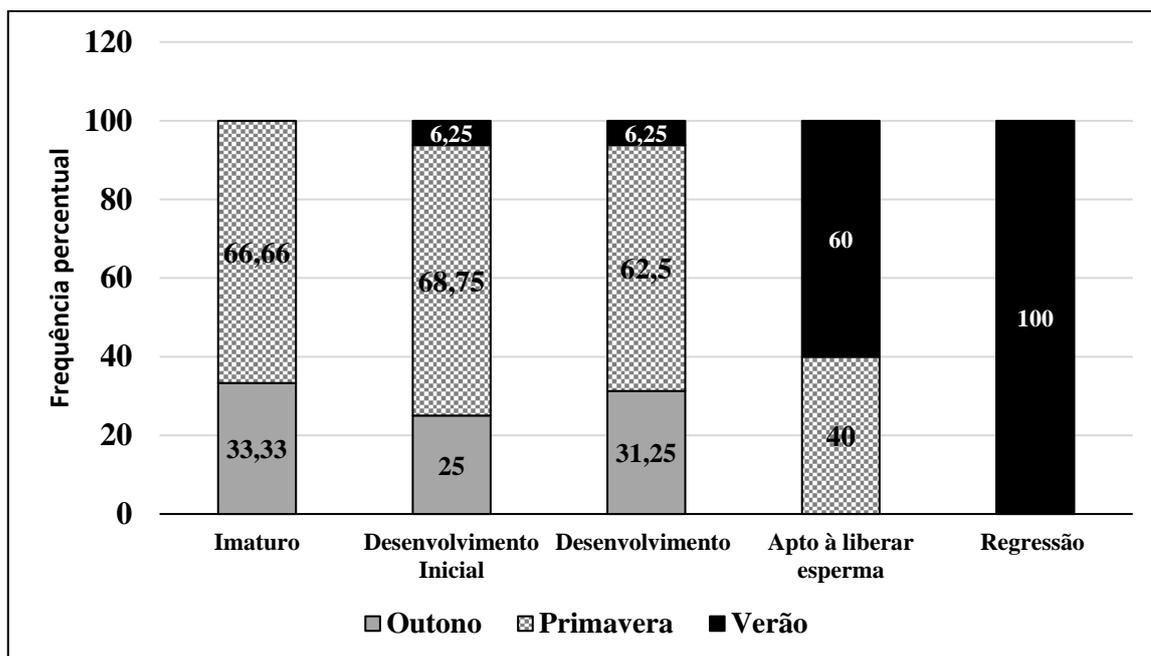
Histologicamente, os testículos foram constituídos por túbulos seminíferos anastomosados, compartimento tubular e organizados em cistos isogênicos contendo células germinativas delimitadas por células somáticas (Células de Sertoli), formando o epitélio germinativo. A presença e/ou tamanho destes cistos, assim como o estágio de desenvolvimento celular presente em cada cisto variou de acordo com a fase reprodutiva. As espermatogônias foram observadas irrestritamente ao longo dos túbulos seminíferos e as células germinativas observadas foram classificadas em seis estágios baseados em suas características histológicas, sendo eles: espermatogônia primária, espermatogônia secundária, espermatócito primário, espermatócito secundário, espermátide e espermatozoide. As características morfológicas das linhagens germinativas observadas encontram-se na tabela 2. A partir de observação macro e microscópica dos testículos, presença e organização das células espermatogênicas e variações no índice gonadossomático, foram identificadas 5 fases reprodutivas, sendo elas: imaturo, desenvolvimento inicial, desenvolvimento, apto à liberação de esperma e regressão (adaptados de Brown-Peterson et al., 2011).

**Tabela 2.** Características morfológicas das células espermatogênicas encontradas em *Brycon orbignyanus* mantidos em condições de cultivo.

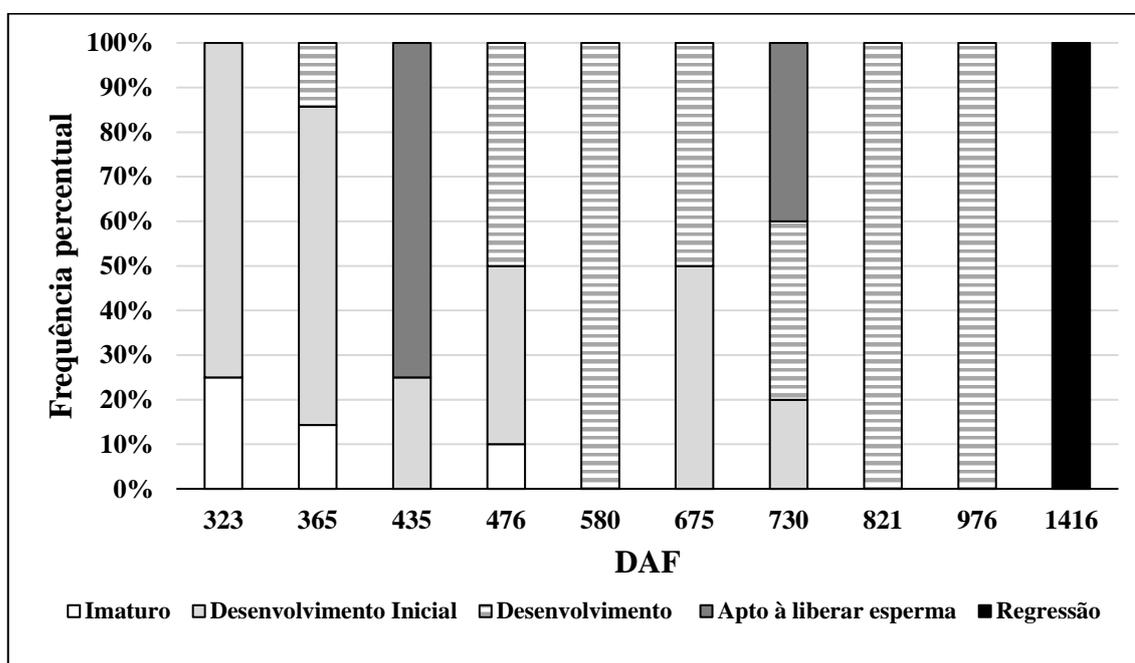
| Estágio celular                                  | Caracterização morfológica  |
|--|---|
| <i>Espermatogônia primária</i> (10,98 ±2,82 μm)  | Maiores células encontradas no tecido, apresentando-se isoladas. Formato arredondado, citoplasma escasso com presença de granulações eosinófilas, núcleo proeminente com nucléolo bem visível. É encontrada em todas as fases reprodutivas.   |
| <i>Espermatogônia secundária</i> (5,84 ±0,93 μm) | Originadas a partir de divisões mitóticas das espermatogônias primárias. São menores que as espermatogônias primárias e formam cistos com poucas células. Apresentam formato arredondado, citoplasma escasso, núcleo evidente e presença ou não de nucléolo. Também podem ser encontradas em todas as fases reprodutivas.   |
| <i>Espermatócito primário</i> (3,83 ±0,27 μm)    | São originários das divisões mitóticas das espermatogônias secundárias. Apresentam formato arredondado e regular com citoplasma escasso. O núcleo é central, esférico e abundante em cromatina, ocupando grande parte da célula. São observados nas seguintes fases reprodutivas: desenvolvimento inicial, desenvolvimento, apto a liberação de esperma e regressão.      |
| <i>Espermatócito secundário</i> (1,68 ±0,08 μm)  | São originários da primeira divisão meiótica dos espermatócitos primários. O núcleo é central com cromatina altamente condensada. Apresentam-se em cistos com maior número que os espermatócitos primários. São encontrados nas seguintes fases reprodutivas: desenvolvimento, apto à liberação de esperma e regressão.   |
| <i>Espermátide</i> (0,30 ±0,02 μm)               | São originárias das divisões meióticas dos espermatócitos secundários, dando início à espermiogênese. Citoplasma escasso com núcleo esférico e fortemente basófilo. Estão sempre organizadas em cistos. Espermátides são observadas nas fases reprodutivas: desenvolvimento, apto à liberação de esperma e regressão.   |
| <i>Espermatozoide</i> (0,20 ±0,01 μm)            | São resultado da espermiogênese, transformações na estrutura celular das espermátides. A menor célula da linhagem germinativa. Apresenta citoplasma escasso e núcleo esférico e denso. São observados em cistos ao longo dos túbulos seminíferos ou no lúmen. São encontrados nas seguintes fases reprodutivas: desenvolvimento, apto à liberação de esperma e regressão. |

### 3.1.Imaturo

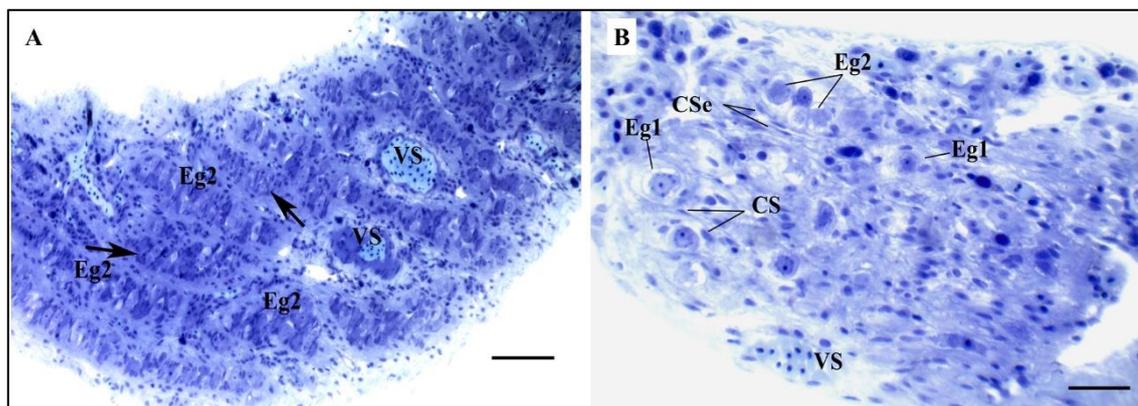
Nesta fase, foram encontrados indivíduos com comprimento total variando entre 16,1 e 26,1 cm peso variando entre 49,2 e 173 g (Tabela 1). Indivíduos nesta fase foram observados apenas no outono e primavera e com idades de 323, 365 e 476 DAF (Figuras 1 e 2). Os testículos de animais considerados imaturos, macroscopicamente são pequenos, translúcidos, filiformes e pares, percorrendo toda a cavidade celomática, desde a papila urogenital até a região ventral da bexiga natatória. Histologicamente, foi possível observar espermatogônias primárias e secundárias ao longo de todo o tecido, envoltas ou não por células somáticas (Figura 3A-B). Ainda nesta fase, foi possível observar as espermatogônias secundárias formando cistos no epitélio germinativo, os quais são delimitados pelas células de Sertoli (Figuras 3A-B). As únicas atividades celulares presentes nesta fase são as divisões mitóticas para a proliferação das espermatogônias e o estágio celular mais avançado de desenvolvimento é a espermatogônia secundária.



**Figura 1.** Distribuição percentual sazonal das 5 fases reprodutivas observadas em *Brycon orbignyanus* em condições de cultivo.



**Figura 2.** Distribuição percentual das fases reprodutivas em relação às idades em dias após a fertilização (DAF) de *Brycon orbignyanus* sob condições de cativeiro.



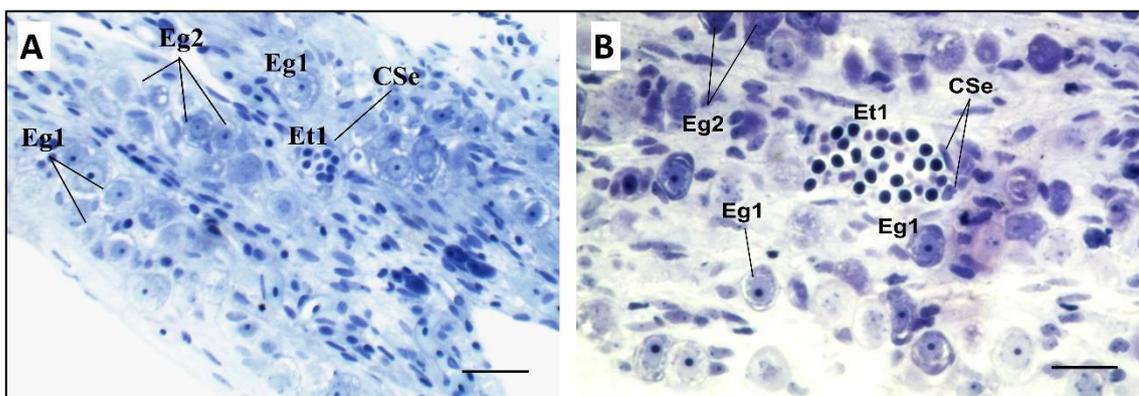
**Figura 3.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase de maturação “imaturado” de *Brycon orbignyanus*. A) Presença de cistos de espermatogônias secundárias e vasos sanguíneos. B) Espermatogônias primárias isoladas ao longo do tecido, delimitadas por extensões citoplasmáticas das células somáticas (Sertoli). As espermatogônias secundárias apresentam-se em cistos delimitadas pelas células de Sertoli. Eg1=espermatogônia primária; Eg2=espermatogônia secundária; CS=célula somática; VS=vaso sanguíneo; flecha=cistos de espermatogônias. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 273 $\mu$ m (A) e 65 $\mu$ m (B).

### 3.2.Desenvolvimento inicial

Indivíduos em desenvolvimento inicial foram observados com comprimento total variando entre 14,2 e 24,4 cm e peso variando entre 36,51 e 257,57 g (Tabela 1). Nesta fase reprodutiva, foram observados indivíduos durante todas as épocas do ano (Figura 1) e o IGS médio entre os indivíduos foi de 0,01 ( $\pm$ 0,01). Os primeiros indivíduos nesta fase foram observados aos 323 DAF, e a partir dos 729 DAF não foram mais observados exemplares em desenvolvimento inicial (Figura 2).

Macroscopicamente, os testículos de animais em desenvolvimento inicial permaneceram filiformes e translúcidos, percorrendo toda a cavidade celomática. A partir de avaliação microscópica, foi possível observar um aumento significativo na quantidade de espermatogônias primárias e secundárias, as quais foram observadas em cistos (Figuras 4A e 4B). As espermatogônias secundárias deram origem aos espermatócitos primários, os quais nesta fase foram observados em cistos ainda com poucas células (Figuras 4A e 4B). Os cistos de espermatócitos primários foram observados ao longo de

todo o tecido e delimitados por células de Sertoli, sendo o estágio celular mais avançado nesta fase reprodutiva (Figura 4B).



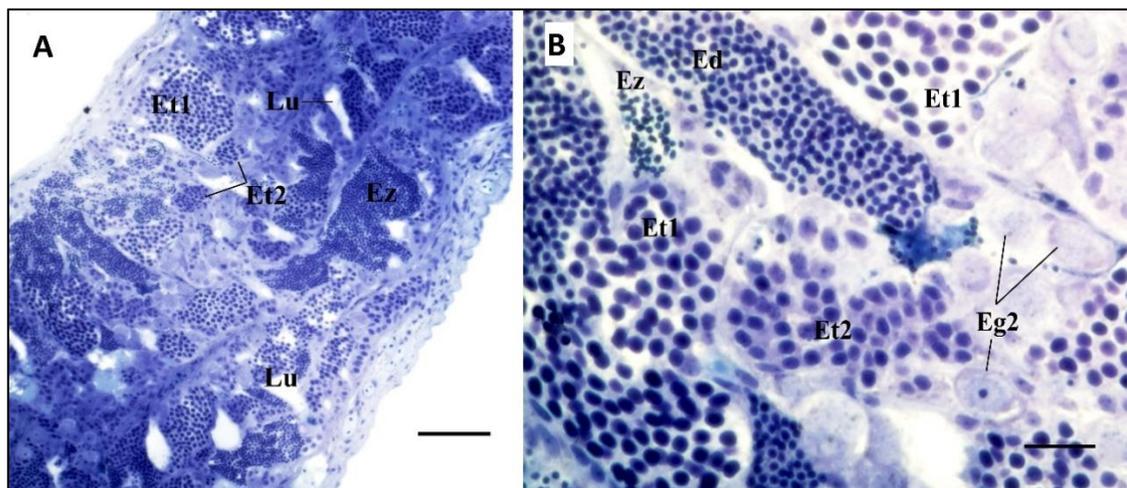
**Figura 4.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase de maturação “desenvolvimento inicial” de *Brycon orbignyanus*. A-B) Cistos com poucos espermatócitos primários e espermatogônias primárias e secundárias. Em B, notar a presença de espermatócitos primários delimitados por processos citoplasmáticos das células de Sertoli. Eg1 = espermatogônia primária; Eg2 = espermatogônia secundária; Et1 = espermatócito primário. CSe = célula de Sertoli. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 273  $\mu$ m (A) e 65 $\mu$ m (B).

### 3.3.Desenvolvimento

Nesta fase foram identificados indivíduos com comprimento total entre 16,7 e 30,5 cm e peso entre 53,46 e 310,10 g (Tabela 1). Foram observados exemplares nesta fase de maturação gonadal em todos os períodos considerados, sendo 62,5% na primavera (Figura 1). Os mais jovens indivíduos nesta fase foram identificados aos 323 DAF, sendo identificados exemplares nesta fase até os 976 DAF. O IGS médio dos indivíduos foi de 0,02 ( $\pm$ 0,02).

Macroscopicamente, os testículos em desenvolvimento tiveram a coloração mais opaca e maior espessura quando comparado às fases reprodutivas anteriores. Histologicamente, foi possível observar cistos contendo células em todos os estágios de desenvolvimento distribuídos irrestritamente por todo o tecido (Figuras 5A e 5B). Nesta fase, a espermatogênese foi intensa, fato observado pelo aumento considerável no tamanho e número de cistos de espermatócitos primários e secundários. Espermatogônias primárias e secundárias foram observadas esporadicamente, geralmente localizadas

próximas aos cistos de espermatócitos primários ou secundários e envoltas por células de Sertoli (Figura 5B). Os espermatozoides foram observados em grande número, porém ainda presentes em cistos (Figuras 5A e 5B). Foi possível observar o lúmen completamente formado nos túbulos seminíferos, porém desprovidos de espermatozoides (Figura 5A).



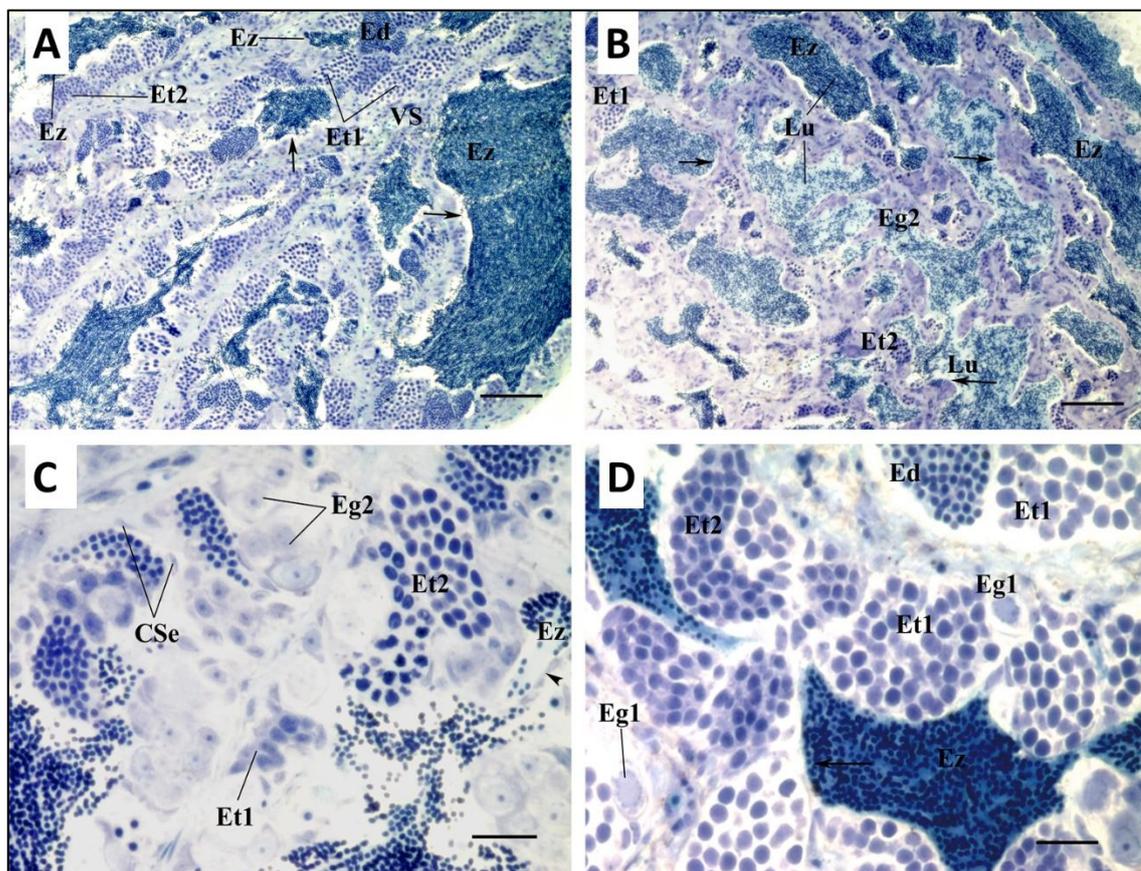
**Figura 5.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase de maturação “desenvolvimento” de *Brycon orbignyanus*. A-B) Cistos de células germinativas em todos os estágios de desenvolvimento e lúmen completamente formado, porém desprovido de espermatozoides. Eg1 = espermatogônia primária; Eg2 = espermatogônia secundária; Et1 = espermatócito primário; Et2 = espermatócito secundário; Ed = espermátide; Ez = espermatozoide; Lu = lúmen. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 273 $\mu$ m (A) e 65 $\mu$ m (B).

### 3.4. Apto a liberar esperma

Nesta fase foram observados exemplares com comprimento total variando entre 22,5 e 30,0 cm e peso variando entre 129,0 e 293,3 g (Tabela 1), distribuídos ao longo da primavera e verão (Figura 1). Indivíduos “aptos a liberar esperma” foram observados apenas aos 435 DAF e 729 DAF. O IGS médio dos indivíduos nesta fase foi de 0,33 ( $\pm 0,23$ ).

Macroscopicamente, os testículos se apresentaram maiores, mais firmes e com coloração mais opaca quando comparados às fases anteriores, ocupando maior espaço na cavidade celomática. Microscopicamente, foi possível observar todos os estágios da espermatogênese ao longo dos túbulos seminíferos (Figuras 6A e 6B). Ao final da

espermiogênese, foi possível observar o rompimento dos cistos de espermatozoides e a sua liberação para o lúmen dos túbulos seminíferos (Figura 6C). O epitélio germinativo se mostrou descontínuo e a quantidade de espermatozoides dentro do lúmen foi variável (Figuras 6A e 6B).

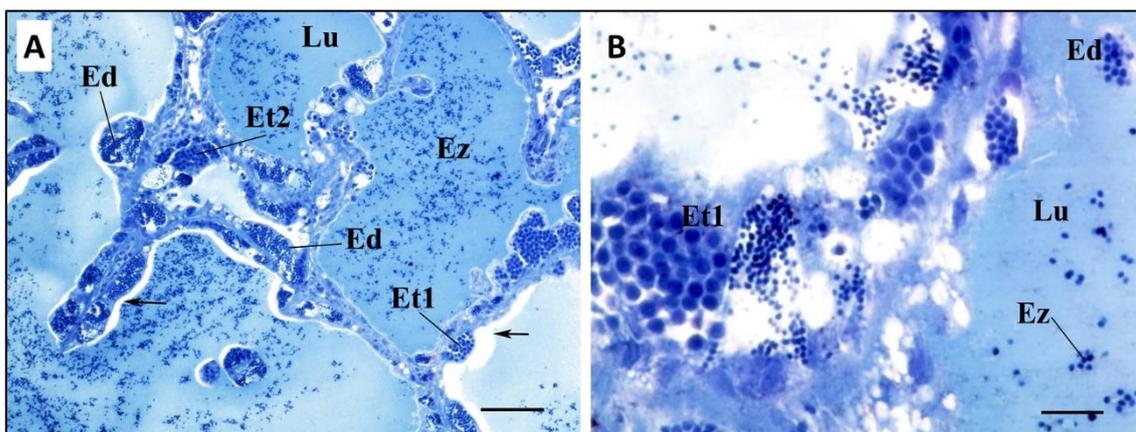


**Figura 6.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase “apto à liberar esperma” de *Brycon orbignyanus*. A-B) Cistos contendo todas as linhagens espermatogênicas e epitélio germinativo descontínuo ao longo do lúmen dos túbulos seminíferos. C) Presença de cistos de espermatócitos primários, secundários, espermatíde e a liberação de espermatozoides para o espaço luminal. D) Espermatogônias primárias isoladas e espermatogênese ativa. Eg1 = espermatogônia primária; Eg2 = espermatogônia secundária; Et1 = espermatócito primário; Et2 = espermatócito secundário; Ed = espermatíde; Ez = espermatozoide; Lu = lúmen; VS = vaso sanguíneo; flecha = epitélio germinativo descontínuo; cabeça de seta = liberação de espermatozoides para o lúmen. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 273 $\mu$ m (A e B) e 65 $\mu$ m (C e D).

### 3.5. Regressão

Esta fase reprodutiva foi identificada a partir da captura de indivíduos que já participaram da reprodução, ou seja, animais que comprovadamente liberaram gametas no período reprodutivo corrente. Indivíduos nesta fase foram observados apenas aos 1416 DAF e apresentaram comprimento total variando entre 37,25 e 42,22 cm e peso entre 805 e 1130 g, sendo identificados apenas no verão. O IGS médio dos exemplares nesta fase de maturação foi de 0,007 ( $\pm 0,001$ ).

Macroscopicamente, os testículos tiveram uma aparência flácida e coloração translúcida. Histologicamente, foi possível observar a presença de espermatozoides residuais no lúmen dos túbulos seminíferos e o epitélio germinativo descontínuo (Figura 7A e 7B). Pouca atividade espermatogênica foi observada, porém foi possível notar a presença de cistos de espermatócitos primários, secundários e espermátides (Figuras 7A e 7B). Espermatogônias primárias e secundárias foram raramente observadas.



**Figura 7.** Fotomicrografia da histologia testicular na fase “regressão” de *Brycon orbignyanus*. A-B) Espermatozoides residuais no lúmen e epitélio germinativo descontínuo. Presença de espermatócitos primários, secundários e espermátides. Et1 = espermatócito primário; Et2 = espermatócito secundário; Ed = espermátide; Ez = espermatozoide; Lu = lúmen; flecha = epitélio germinativo descontínuo. Coloração: Azul de Toluidina. Escala = 273 $\mu$ m (A) e 65 $\mu$ m (B).

#### 4. DISCUSSÃO

A caracterização morfológica dos testículos de *B. orbignyanus*, com os túbulos seminíferos se intercomunicando uns com os outros formando anastomoses, nos permite classifica-los como “tubular anastomosado”, assim como descrito para grupos mais basais

de peixes teleósteos (Parenti & Grier, 2004). De acordo com Grier (1981), neste tipo de testículo, as espermatogônias e as células de Sertoli a elas associadas formam cordões dentro dos túbulos com espaços descontínuos que representam o lúmen. Ao longo da espermatogênese, as células de Sertoli formam e delimitam os espermatocistos, onde a espermatogênese ocorre de maneira sincrônica e completa. Esta distribuição das espermatogônias se deu de maneira irrestrita ao longo dos túbulos seminíferos, apresentando-se isoladas quando ainda são consideradas primárias ou já formando cistos, sendo denominadas a partir disto como espermatogônias secundárias (Uribe et al., 2015). Esta distribuição das espermatogônias nos permitiu confirmar a caracterização do compartimento germinativo de *B. orbignyanus* como espermatogonial irrestrito (Grier, 1980), arranjo observado em espécies que apresentam testículo tubular anastomosado (Grier, 1981; Batlouni et al., 2006; Freitas et al., 2013; Mazzoni et al., 2014).

Em peixes, a espermatogênese é dividida em três fases: a mitótica ou espermatogonial, onde ocorrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias; fase meiótica, com o surgimento dos espermatócitos primários e secundários; e por fim, a fase espermiogênica, onde as espermatídes se diferenciam e sofrem alterações morfológicas e funcionais drásticas, formando os espermatozoides (Russel et al., 1990; Hess & França, 2007; Nóbrega et al., 2009). Este processo é geralmente contínuo em espécies que apresentam testículo do tipo tubular, ocorrendo assim uma sobreposição entre as fases espermatogênica e espermiogênica durante o período reprodutivo (Schulz & Miura, 2002; Mylonas et al., 2003). Esta sobreposição foi identificada em *B. orbignyanus*, já que nas fases reprodutivas mais avançadas (desenvolvimento e apto a liberação de esperma) os três processos acima mencionados ocorreram praticamente de maneira simultânea.

Nos machos, a caracterização histológica das fases reprodutivas tem por base as alterações que ocorrem no epitélio dos túbulos seminíferos ao longo do ciclo reprodutivo, considerando a presença ou ausência de espermatocistos e o tipo de células germinativas contidas nos cistos (Quagio-Grassiotto et al., 2013). Em função da enorme diversidade de estratégias reprodutivas utilizadas por teleósteos, a escala de maturação gonadal e a denominação das diferentes fases reprodutivas em determinada espécie pode não ser aplicada para outras (Ferreira & Godinho, 1990). Além disso, muitas vezes diferentes nomenclaturas são utilizadas para descrever características semelhantes ou fases

reprodutivas similares, dificultando estudos comparativos entre diferentes espécies. No presente estudo, indivíduos “imatuross” foram considerados aqueles que apresentaram apenas espermatogônias primárias e secundárias. O padrão morfológico e o tamanho médio das espermatogônias observadas em *B. orbignyanus* foram semelhantes ao observado em outras duas espécies de characiformes, *Salminus franciscanus* e *Astyanax scabripinis* (Freitas et al., 2013; Veloso-Júnior et al., 2009). Estes autores observaram espermatogônias primárias com tamanho médio de 7,85  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,73 \mu\text{m}$ ) e 7,5 ( $\pm 0,9 \mu\text{m}$ ) respectivamente, enquanto as espermatogônias secundárias mediram 4,69  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,49 \mu\text{m}$ ) e 5,6  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,6 \mu\text{m}$ ) respectivamente. No geral, machos imatuross são caracterizados principalmente pela presença de espermatogônias primárias, sendo que espermatogônias secundárias são raramente observadas (Brown-Peterson et al., 2011). No entanto, esta determinação varia de acordo com a metodologia e classificação utilizada por cada autor em cada fase reprodutiva. Siqueira-Silva et al. (2013) denominou esta fase como sendo “preparatória” em *Cichla kelberi*, onde foi observada a presença de populações contínuas de espermatogônias primárias e secundárias, envoltas por extensões citoplasmáticas das células de Sertoli. De maneira semelhante, Batlouni et al. (2006) consideraram esta fase como maturação inicial em *Pseudoplatystoma fasciatum*. Boa parte dos autores não consideram a fase “imatuross” como parte do ciclo reprodutivo (Romagosa et al., 2000; Batlouni et al., 2006; Gonçalves et al., 2006; Oliveira et al., 2010; Brandão et al., 2017), uma vez que nesta fase a proliferação das oogônias e oócitos em crescimento primário nas fêmeas e espermatogônias nos machos ainda é independente da ação dos hormônios gonadotróficos (Brown-Peterson et al., 2011), portanto, pouco relacionada com as variáveis ambientais que funcionam como gatilhos para os processos reprodutivos.

A fase “desenvolvimento” foi subdividida e adaptada em “desenvolvimento inicial” e “desenvolvimento” em função de algumas diferenças observadas na presença e distribuição das células espermatogênicas (Brown-Peterson et al., 2011). Indivíduos em “desenvolvimento inicial” apresentaram cistos contendo espermatócitos primários como estágio celular mais avançado da gametogênese. As características dos espermatócitos primários descritas no presente estudo se assemelharam às relatadas para outros characiformes em análise realizada a partir de microscopia de luz, como formato arredondado, citoplasma escasso, núcleo centralizado e condensado, apresentando-se sempre em cistos contendo número variável de células e delimitados por células de Sertoli

(Romagosa et al., 2000; Veloso-Júnior et al., 2009; Schulz et al., 2010; Freitas et al., 2013). O tamanho médio dos espermatócitos primários se assemelhou ao obtido por Veloso-Júnior et al. (2013) em estudo realizado com *A. scabiprinis*, onde o autor verificou um diâmetro nuclear médio de  $3,9 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,4 \mu\text{m}$ ). Em análise semelhante realizada com *S. franciscanus*, Freitas et al. (2013) relataram diâmetro médio  $4,56 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,51 \mu\text{m}$ ). De acordo com Brown-Peterson et al. (2011), na subfase “desenvolvimento inicial”, os espermatocistos apresentam predominantemente espermatogônias secundárias e espermatócitos primários, assim como observado no presente estudo. Segundo os mesmos autores, nesta fase os primeiros espermatócitos secundários podem ser visualizados, fato não confirmado em *B. orbignyana*.

Os testículos de *B. orbignyana* em “desenvolvimento” apresentaram células germinativas em todos os estágios espermatogênicos, incluindo espermatídes e espermatozoides. Esta fase é considerada como sendo uma preparação para a estação reprodutiva e indica que os machos de fato atingiram a maturação sexual (Brown-Peterson et al., 2011). Os primeiros indivíduos que atingiram esta fase foram observados aos 365 DAF (14,28%), indicando que esta é a idade em que se os machos começam a se tornar maduros, porém ainda não aptos à reprodução. A caracterização morfológica e estrutural dos espermatócitos secundários, espermatídes e espermatozoides de maneira geral foram semelhantes ao observado em outros teleósteos (Cruz-Landim et al., 2003; Bazzoli, 2003; Veloso-Júnior et al., 2009; Uribe et al., 2015). No entanto, o diâmetro médio verificado para os três estágios espermatogênicos mencionados foi menor quando comparado a outros characiformes. Veloso-Júnior et al. (2009) observaram espermatócitos secundários com diâmetro nuclear médio de  $3,0 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,5 \mu\text{m}$ ), espermatídes com  $2,1 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,3 \mu\text{m}$ ) e espermatozoides medindo  $1,8 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,4 \mu\text{m}$ ) em *A. scabiprinis*. Em estudo realizado com *S. franciscanus*, Freitas et al. (2013) observaram espermatócitos secundários, espermatídes e espermatozoides medindo  $2,90 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,44 \mu\text{m}$ ),  $2,34 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,51 \mu\text{m}$ ) e  $1,56 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,50 \mu\text{m}$ ) respectivamente. O desenvolvimento das gônadas e dos gametas passam a ser dependentes dos hormônios gonadotróficos quando os peixes entram em “desenvolvimento”, e uma vez que atingem esta fase permanecerão sempre no ciclo reprodutivo, não retornando para a fase “imaturado” (Brown-Peterson et al., 2011).

Ao final da espermiogênese, ocorre o rompimento dos espermatocistos e liberação dos espermatozoides para dentro do lúmen (Schulz et al., 2010). Em *B. orbignyanus*, este evento marcou o início da fase reprodutiva “apto à liberação de esperma”, fase observada em animais aos 435 DAF e 730 DAF durante o final da primavera e verão. Em algumas espécies, a liberação das células germinativas para o espaço luminal ocorre já em estágio de espermatíde, sendo a espermiogênese finalizada dentro do lúmen. Este tipo de espermatogênese é chamada semicística (Mattei, 1993). No caso de *B. orbignyanus*, assim como ocorre na maioria dos teleósteos (Grier e Uribe-Aranzábal, 2009; Schulz et al., 2010; Quagio-Grassiotto et al., 2013), os espermatozoides que estavam dentro dos cistos durante a fase de “desenvolvimento” são liberados para o lúmen já completamente formados, sendo este tipo de espermatogênese chamada de cística. Esta fase indica que no período reprodutivo corrente os indivíduos estarão aptos a participar da reprodução em função do avançado estágio de desenvolvimento dos gametas, o que os tornam aptos a receber os estímulos hormonais para a liberação dos mesmos (Brown-Peterson et al., 2011). Os machos de *B. orbignyanus* em condições de cativeiro atingem esta etapa sem a necessidade de aplicação de métodos de indução hormonal, algo recorrente na aquicultura convencional. De acordo com Mylonas et al. (1998), a aplicação destes métodos de indução hormonal é mais direcionada para induzir a espermiogênese ou aumentar a produção de fluido seminal, permitindo assim a liberação de um maior número de espermatozoides dos espermatocistos, aumentando o volume de sêmen produzido. Apesar da espermiogênese e liberação dos gametas ocorrer sem problemas em peixes mantidos em cativeiro, esta última somente ocorre em caso de utilização do indivíduo na reprodução artificial através da captura e extrusão manual do sêmen. Esta prática permite a identificação macroscópica de mais uma subfase reprodutiva, denominada “liberação ativa de esperma”, onde o sêmen é liberado sob leve pressão abdominal (Brown-Peterson et al., 2011; Quagio-Grassiotto et al., 2013). No presente estudo, os indivíduos considerados “aptos à liberação de esperma” se encontravam também em “liberação ativa de esperma”, uma vez que no momento da coleta foi possível verificar a liberação de sêmen sob leve pressão abdominal.

De acordo com Brown-Peterson et al. (2011), os machos permanecem “aptos à liberar esperma” durante todo o período reprodutivo, no entanto algumas alterações no epitélio germinativo podem ser verificadas ao longo deste período. Estas alterações

permitem subdividir esta fase em três principais etapas de acordo com as características do epitélio germinativo: inicial, intermediária e final, de acordo com a presença e ausência de epitélio germinativo descontínuo. Na subfase inicial, o epitélio germinativo se mantém contínuo ao longo de todo o testículo, diferentemente do que ocorre na fase intermediária, onde a espermatogênese cessa em alguns cistos, tornando o epitélio germinativo descontínuo em algumas regiões próximas ao ducto espermático. Já na subfase final, o epitélio germinativo torna-se descontínuo ao longo de todo o testículo e a atividade espermatogênica se reduz. No presente estudo, foram observados apenas testículos já com o epitélio germinativo descontínuo. Isto nos permite afirmar que, dentro do mesmo período reprodutivo, podem ser observados indivíduos mais precoces, os quais já se encontram em fase final da espermiogênese em dezembro, e indivíduos mais tardios, os quais se encontram em fase final da espermiogênese apenas em fevereiro. De acordo com Mylonas et al. (2010), este maior período de espermiogênese é comum em populações selvagens, sendo favorável à manutenção da variabilidade genética, uma vez que com isso os machos podem fertilizar os ovos de várias fêmeas ao longo do período reprodutivo.

O final do período reprodutivo em *B. orbignyana* sob condições de cativeiro foi marcado pela presença de indivíduos em “regressão”. Esta fase foi considerada em indivíduos que comprovadamente participaram da reprodução e liberaram gametas viáveis. Após o final do ciclo reprodutivo, normalmente os testículos entram em “regeneração”, fase que se caracteriza por uma preparação para o novo ciclo reprodutivo e precede a retomada do “desenvolvimento” dos testículos (Brown-Peterson et al., 2011). No entanto, “regeneração” não foi identificada no presente estudo, já que os animais que comprovadamente participaram da reprodução (liberaram gametas) foram analisados logo depois e classificados em “regressão”. A ocorrência de indivíduos em “desenvolvimento” em praticamente todas as estações do ano e em todas as idades analisadas, confirma a enorme variação individual em relação aos ciclos anuais em *B. orbignyana* e a rápida retomada do ciclo reprodutivo mencionada anteriormente, tornando a fase de maturação “regeneração” provavelmente muito curta e efêmera. A partir das análises realizadas, é impossível determinar se os exemplares nesta fase estão entrando no ciclo reprodutivo pela primeira vez, como provavelmente ocorre em animais aos 365 DAF, ou estão retomando o desenvolvimento e se preparando para o próximo ciclo reprodutivo, como possivelmente ocorre em indivíduos aos 729 DAF.

O IGS, índice biológico bastante utilizado para complementar estudos relacionados à biologia reprodutiva (Vazzoller, 1996), apresentou grandes variações ao longo de cada fase. Estas variações acompanharam o ciclo reprodutivo, portanto podendo ser útil como marcador adicional das fases reprodutivas e dos ciclos anuais em *B. orbignyanus*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Batlouni, S. R., Romagosa, E., & Borella, M. I. (2006). The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium: An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science*, *96*, 116-132. [doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.11.012](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.11.012)
- Bazzoli, N. (2003). Reproductive parameters of fishes of comercial interest in the region of Pirapora. In: *Waters, fishes and fisheries of the São Francisco River of Minas Gerais*. H. P. Godinho and A. L. Godinho (Orgs.). Belo Horizonte, MG: PUC Minas.
- Brandão, L. E D., Nascimento, A. V., Marcon, L., dos Santos, J. E., Santiago, K. B., Rizzo, E., & Bazzoli, N. (2017). Comparative analyses of reproductive activity in *Schizodon knerii* (Steindachner, 1875) (Characiformes: Anostomidae) in three sections of the São Francisco River basin. *Journal of Applied Ichthyology*, *33*, 1119-1124. [doi: 10.1111/jai.13457](https://doi.org/10.1111/jai.13457)
- Brown-Peterson N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., & Lowerre-Barbieri, S. K. (2011) A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, *3*, 52–70. [doi: 10.1080/19425120.2011.555724](https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555724).
- Cruz-Landim, C. D., Abdalla, F. C., & Cruz-Höfling, M. A. D. (2003). Morphological study of the spermatogenesis in the teleost *Piaractus mesopotamicus*. *Biocell*, *27*, 319-328.
- Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. (2017). Species by family/subfamily. Retirado de: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.
- Ferreira, R. M. A., & Godinho, H. P. (1990). Reproductive biology of the white-piau *Schizodon knerii* (Steindachner, 1875) (Anostomidae) from a reservoir in southeast Brazil. *European Archives of Biology*, *101*, 331-344.

- Freitas, L. J. A., Prado, P. S., Arantes, F. P., Santiago, K. B. Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E. (2013). Reproductive biology of the characid dourado *Salminus franciscanus* from the São Francisco River, Brasil. *Animal Reproduction Science*, 139, 145-154. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.03.013.
- Gonçalves, T. L., Bazzoli, N., & Brito, M. F. G. (2006). Gametogenesis and reproduction of the matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) (Pisces: Characidae) in the São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 66, 513-522. doi:10.1590/S1519-69842006000300018.
- Gonçalves, T. L., Bazzoli, N., & Brito, M. F. G. (2006). Gametogenesis and reproduction of the matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) (Pisces: Characidae) in the São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 66, 13-22.
- Grier, H. J. (1981). Celular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *The American Zoology*, 21, 345-357. doi:10.1093/icb/21.2.345.
- Grier, H. J., & Aranzábal, M. C. (2009). The testis and spermatogenesis in teleost. In: Jamieson BGM (Ed.). *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Neoteleostomi). Phylogeny-Reproductive System Viviparity-Spermatozoa*. Enfield: Science Publishers.
- Grier, H. J., & Taylor, R. G. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*, 53: 521-542.
- Grier, H. J., Linton, J. R., Leatherland, J. F., & De Vlaming, V. L. (1980). Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *American Journal of Anatomy*, 159, 331-345. doi: 10.1002/aja.1001590307.
- Harry J. Grier. (1981). Cellular Organization of the Testis and Spermatogenesis in Fishes. *American Zoology*, 21, 345-357.
- Hess, R. A., & França, L. R.. (2007). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng, C.Y. (Ed.). *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Austin, Tx: Landes Bioscience.
- Lima, F. C. T. (2003). Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (Eds.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, RS: EDIPUCRS.

- Lopera-Barrero, N. M. (2009). Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. *Ciência e Investigación Agraria*, 36, 191-208.
- Machado, A. B. M., Drummond, G. M., Paglia, A. P. (2008). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente.
- Martins, Y., Simões, D. F. de M., Santos, G. B., Rizzo, E., & Bazzoli, N. (2010). Comparative folliculogenesis and spermatogenesis of four teleost fish from a Reservoir in south-eastern Brazil. *Acta Zoologica*, 91, 466-473. doi: 10.1111/j.1463-6395.2009.00437.x.
- Mattei, X. (1993). Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. *Journal of Fish Biology*, 43, 931-937. doi: 10.1111/j.1095-8649.1993.tb01167.x.
- Mazzoni, T. S., Grier, H. J., & Quagio-Grassiotto, I. (2014). Male Gonadal Differentiation and the Paedomorphic Evolution of the Testis in Teleostei. *The Anatomical Record*, 297, 1137–1162. doi: 10.1002/ar.22915.
- Muñoz, M. E., Batlouni, S. R., Vicentini, I. B. F., & Vicentini, C. A. (2011). Testicular structure and description of the seminal pathway in *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae, Teleostei). *Micron*, 42, 892–897. doi:10.1016/j.micron.2011.06.008.
- Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 516-534. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.007.
- Mylonas, C. C., Papadaki, M., & Divanach, P. (2003). Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquaculture Research*, 34, 1161-1170. doi: 10.1046/j.1365-2109.2003.00922.x.
- Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C. & Pavanelli, C. S. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá, PR: Eduem.
- Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., & França, L. R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem*, 35, 197–206. doi:10.1007/s10695-008-9252-z.

- Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., & França, L. R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 197–206. doi: 10.1007/s10695-008-9252-z.
- Oliveira, C. L. C., Fialho, C. B., & Malabarba, L. R. (2010). Reproductive period, fecundity and histology of gonads of two cheirodontines (Ostariophysi: Characidae) with diferente reproductive strategies - insemination and external fertilization. *Neotropical Ichthyology*, 8, 351-360. doi: 10.1590/S1679-62252010000200014.
- Panarari-Antunes, R. S., Prioli, A. J., Prioli, S. M. A. P., Galdino, A. S., Julio Junior, H. F., & Prioli, L. M. (2011). Genetic Variability of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Characidae) in Cultivated and Natural Populations of the Upper Paraná River, and Implications for the Conservation of the Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 839-848.
- Parenti, L. R., & Grier, H. J. (2004). Evolution and Phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 44, 333–348. doi: 10.1093/icb/44.5.333.
- Quagio-Grassiotto, I., Wildner, D. D., & Ishiba, R. (2013). Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37, 181-191.
- Rodriguez-Rodriguez, M. P., Lopera-Barrero, N. M., Ribeiro, R. P., Povh, J. A., Vargas, L., Sirol, R. N., & Jacometo, C. B. (2010). Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45, 56-63.
- Romagosa, E., Narahara, M. Y., Ayroza, L. M. da S., Borella, M. I., & Fenerich-Verani, N. (2000). Reproductive cycle of male matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). *Brazilian Journal of Morphology Science*, 17, 101 – 105.
- Ross, L.G., & Ross, B. (2008) *Anaesthetic and sedative techniques for Aquatic Animals* (3th ed.) Oxford: Blackwell Publishing.
- Russel, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A. P., & Clegg, E. D. (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, Fl: Cache River Press.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 390-411. doi: [10.1016/j.ygcen.2009.02.013](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013).

Schulz, R., W., & Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 43–56.

Siqueira-Silva, D. H., Vicentini, C. A., Ninhaus-Silveira, A., & Veríssimo-Silveira, R. (2013). Reproductive cycle of the Neotropical cichlid yellow peacock bass *Cichla kelberi*: A novel pattern of testicular development. *Neotropical Ichthyology*, 11, 587-596.

Uribe, M. C. H., Grier, J. & Mejía-Roa, V. (2014). Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis*, 4, e983400. doi: 10.4161/21565562.2014.983400.

Vanin, A. S., Giora, J., & Fialho, C. B. (2017). Life history of *Gymnotus refugio* (Gymnotiformes;Gymnotidae): an endangered species of weakly electric fish. *Environmental Biology of Fishes*, 100, 69-84. doi: 10.1007/s10641-016-0556-z.

Vazzoler, A. E. A. M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá, PR: EDUEM, 1996.

Veloso-Júnior, V. C., Guimarães-Cruz, R. J., Barros, M. D. M., Barata, R. S. L., & Santos, J. E. (2009). Reproduction of the lambari *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces: Characidae) in a small stream in Southeastern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 25, 314–320. doi: 10.1111/j.1439-0426.2008.01152.x.

Zaniboni Filho, E., & Schulz, U. H. (2003). Uruguay River. In: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status. Ottawa, On: World Fisheries Trust.

## **CAPÍTULO V**

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A espécie em estudo, *B. orbignyana* vem sofrendo um declínio populacional drástico nos últimos anos em função de ações antrópicas. Com isso, a espécie atualmente encontra-se ameaçada de extinção em várias bacias hidrográficas brasileiras. Em casos críticos, onde os estoques naturais em determinadas bacias praticamente desapareceram, o reprovoamento surge como alternativa viável para a conservação desta espécie. No entanto, alguns critérios importantes relacionados ao manejo produtivo e reprodutivo devem ser levados em consideração para a obtenção de sucesso no uso desta ferramenta.

Em observações empíricas realizadas ao longo dos anos, suspeitava-se que sob condições de cativeiro a razão sexual das populações de *B. orbignyana* apresentava desvio em favor dos machos, fato que pode limitar o uso da espécie em estações de piscicultura, tanto para fins comerciais, quanto para o uso em programas de reintrodução, uma vez que este desequilíbrio afeta diretamente a variabilidade genética dos lotes ao longo dos anos, podendo acelerar o processo de extinção. Por se tratar de um parâmetro ecológico extremamente importante, os aspectos populacionais relacionados a razão sexual nortearam o desenvolvimento desta tese.

No primeiro estudo, a partir de observações em uma estação de piscicultura comercial, a proporção sexual entre machos e fêmeas se mostrou desequilibradas em determinadas fases do crescimento. Com esta confirmação, foi necessário o desenvolvimento de outro estudo, objetivando-se conhecer os processos de diferenciação sexual e gonadal, visando futuramente validar metodologias eficientes de manipulação sexual. Desta forma, os processos de diferenciação gonadal e o período em que ele se completa foi descrito, permitindo assim identificar os melhores momentos para a aplicação de tratamentos térmicos e outros, visando a manipulação sexual.

Todas as ferramentas utilizadas para a conservação de *B. orbignyana* passam pelo completo entendimento e domínio dos aspectos reprodutivos da espécie, os quais variam de acordo com as diferentes condições ambientais em que os indivíduos estão inseridos. Portanto, um terceiro estudo foi realizado com o intuito de descrever e conhecer o ciclo anual de *B. orbignyana* em condições de cultivo, a fim de validar uma escala de maturação para a espécie. Diferentemente do que ocorre em habitats naturais, foram identificadas apenas cinco fases reprodutivas, uma vez que em condições de cativeiro não ocorre desova natural, apenas através de indução hormonal.

Todos estes resultados foram importantes para esclarecer algumas lacunas referentes à estruturação populacional, mecanismos e processos de determinação e diferenciação sexual e ciclos reprodutivos da espécie em condições de cativeiro. Por mais que seja necessária a condução de estudos mais aprofundados em relação aos aspectos genéticos e fisiológicos da determinação e diferenciação sexual, estas informações podem servir como base para a elaboração de ferramentas relacionadas à produção e conservação desta e de outras espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K. T. et al. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 152, p. 1-15, 2014.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM, 2007. 501 p.
- AGOSTINHO, A. A. et al. Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. **River Research and Applications**, Chichester, v. 18, n. 3, p. 299-306, 2002.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 646-652, 2005.
- AZAZA, M. S.; DHRAÏEF, M. N.; KRAÏEM, M. M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 98-105, 2008.
- BARBOSA, R. P. **Diferenciação gonadal em *Piaractus mesopotamicus***. 2015. 42 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.
- BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 130, n. 4, p. 399-409, 2001.
- BAROILLER, J. F.; FOSTIER, A.; JALABERT, B. Temperature and sex chromossomes govern sex ratios of mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 273, n. 3, p. 216-223, 1995.
- BAROILLER, J. F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 55, n. 6-7, p. 910-931, 1999.
- BARRELLA, W.; PETRERE Jr.; M. The influence of environmental factors on fish community structure in the Jacaré Pepira River, Brazil. In: COWX, I. G. (Ed.). **Rehabilitation of freshwater fisheries**. London: Fishing News Book, 1994. p. 161-170.
- BEZAULT, E. et al. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

adapted to extreme temperature conditions. **Aquaculture**, Maine, v. 272S1, supl. 1, p. S3-S16, 2007.

BONE, Q.; MOORE, R. H. (Ed.). **Biology of Fishes**. New York: Taylor & Francis Group, 2008. 478 p.

BRITTO, S. G. C. et al. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, 2006. 112 p.

BULL J. J. **Evolution of sex determining mechanisms**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1983. 316 p.

CAROLSFELD, J. et al. **Migratory Fishes of South America**. Biology, Fisheries and Conservation Status. Ottawa: World Fisheries Trust, 2003. 373 p.

CAVALCANTI, C. A. **Proteases digestivas em juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Pisces: Characidae) e a aplicação técnica de digestibilidade *in vitro***. 1998. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

CESAR M. P. et al. Métodos para obtenção de população monosexo na piscicultura. **Boletim Agropecuário**, Lavras, v. 69, p. 1-27, 2005.

CONOVER, D. O.; FLEISHER, M. H. Temperature-sensitive period of sex determination in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 514-520, 1986.

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

DALE, V. H.; BEYELER, S. C. Challenges in the development and use of ecological indicators. **Ecological Indicators**, Coimbra, v. 1, n. 1, p. 3-10, 2001.

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

ESCHMEYER, W. N.; Fong, J. D. **Species by family/subfamily**. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

ESPINACH ROS, A.; RÍOS PARODI, C. **Conservación de la fauna ictica en el Embalse de Salto Grande**. [S.l.: s.n.], 1997. 37 p.

FAUSCH, K. D. et al. Fish communities as indicators of environmental degradation. **American Fisheries Society Symposium**, v. 8, p. 123-144, 1990.

FISHER, R. A. **Genetical theory of natural selection**. Oxford: Clarendon Press: 1930. 272 p.

GARCÍA-ALONSO, J. et al. Gonad plasticity and gametogenesis in the endangered Spanish toothcarp *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae). **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 41, n. 3, p. 206-213, 2009.

GARCIA-CARREÑO, F. L. et al. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus*: characteristics and effects of protein quality. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 132, n. 2, p. 343-352, 2002.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil, Subordem Characoidei, Bacia do rio Mogi Guassu**. Piracicaba: Editora Franciscana, 1975. 4 v.

GOTO, R. et al. Effects of temperature on gonadal sex determination in barfin flounder *Verasper moseri*. **Fisheries Science**, Tokio, v. 65, n. 6, p. 884-887, 1999.

GRIER, H. J.; URIBE M. C.; PARENTI, L. R. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, Munich, v. 268, n. 4, p. 293-310, 2007.

HARDY, I. C. W. **Sex ratios. Concepts and Research Methods**. Cambridge: University Press, 2002. 424 p.

HOSTACHE, G.; PASCAL, M.; TESSIER, C. Influence de la température d'incubation sur le rapport mâle, femelle chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancock (1828). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 73, n. 7, p. 1239-1246, 1995.

IHERING, R. VON. **Da vida dos peixes**. São Paulo: Melhoramentos, 1929. 149 p.

JALABERT, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fishes. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 45, n. 3, p. 261-279, 2005.

KOUMOUNDOURUS, G. et al. Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 292, n. 6, p. 573-579, 2002.

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (Ed.). **Check list of the freshwater**

**fishes of South and Central America.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 330-350.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sódio. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 77-86, 2008a.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N. Variabilidad genética de lotes de *Brycon orbignyanus* utilizados en programas de repoblamiento: manejo y conservación. **Acta biológica Colombiana**, Bogotá, v. 13, n. 1, p. 107-118, 2008b.

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciência e Investigación Agraria**, Santiago, v. 36, n. 2, p. 191-208. 2009.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Caracterização genética de *Brycon orbignyanus* utilizando o sistema seminatural. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 1, p. 184-191, 2010.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Diversidad genética y contribución reproductiva de una progenie de *brycon orbignyanus* en el sistema reproductivo seminatural, usando marcadores microsatélites. **Agrociencia**, Montecillo, v. 44, n. 2, p. 171-181, 2010.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Diversidade genética e paternidade de progênes de *Brycon orbignyanus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 541-554, 2014.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. 908 p.

MAGERHANS, A.; MÜLLER-BELECKE, A.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Effect of rearing temperatures post hatching on sex ratios of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations. **Aquaculture**, Maine, v. 294, n. 1-2, p. 25–29, 2009.

MEIJIDE, F. J.; LO NOSTRO, F. L.; GUERRERO, G. A. Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light- and Electron-Microscopic Study. **Journal of Morphology**, Munich, v. 264, n. 2, p. 191–210, 2005.

- METZGER, J. P.; CASATTI, L. Do diagnóstico à conservação da biodiversidade: o estado da arte do programa BIOTA/FAPESP. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 1-23, 2006.
- MEURER, S. **Digestibilidade aparente da matéria seca, proteína e energia brutas de alguns ingredientes para juvenis de piracanjuba, *Brycon orbignyana***. 1999. 91 p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.
- NAKAMURA, M. et al. Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish. **Journal of Experimental Zoology**, Austin, v. 281, n. 5, p. 362–372, 1998.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the world**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006. 752 p.
- NIEUWKOOP, P. D.; STASURYA, L. A. **Primordial germ cells in the chordates. Embryogenesis and Phylogenesis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. 187 p.
- NOMURA, T. et al. Effect of temperature on sex ratios of normal and gynogenetic loach. **Fisheries Sciences**, Tokio, v. 64, n. 5, p. 753-758, 1998.
- OLIVEIRA, C. et al. Phylogenetic relationships within the species of Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 11, n. 275, 2011.
- OLIVEIRA, D. J. et al. Conservation Status of the “Piracanjuba” *Brycon orbignyana* (Valenciennes, 1850) (Characiformes, Bryconidae): Basis for Management Programs. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 18-33, 2017.
- OMOTO, N. et al. Gonadal sex differentiation and effect of rearing temperature on sex ratio in black rockfish (*Sebastes schlegelii*). **Ichthyological Research**, Kioto, v. 57, n. 2, p. 133-138, 2010.
- OSPINA-ÁLVAREZ, N.; PIFERRER, F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited. Prevalence, existence of a single sex ratio response pattern and possible effects of climate change. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 7, e2837, 2008.
- OTANI S. et al. The formation of primordial germ cells from germline cells in spherical embryos derived from the blastodisc of 2-cell embryos in goldfish, *Carassius auratus*. **International Journal of Development Biology**, Vizcaya, v. 49, n. 7, p. 843-850, 2005.
- PAIVA, M. P. **Grandes Represas do Brasil**. Brasília: Editerra, 1982. 292 p.

PAN, Z. J. et al. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in cultured Ussuri catfish *Tachysurus ussuriensis*. **Journal of Fish Biology**, Vancouver, v. 91, n. 3, p. 866–879, 2017.

PANARARI-ANTUNES, R. S. et al. Genetic Variability of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Characidae) in Cultivated and Natural Populations of the Upper Paraná River, and Implications for the Conservation of the Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 4, p. 839-848, 2011.

PANDIAN, T. J. **Sexuality in fishes**. Enfield: Science Publishers, 2011. 189 p.

PATIÑO, R. et al. Sex differentiation of channel catfish gonads: Normal development and effects of temperature. **The Journal of Experimental Zoology**, Austin, v. 276, n. 3, 209-218, 1996.

PIFERRER, F. Determinación y diferenciación sexual en los peces. In: ESTÉVEZ, M. A. C. (Ed.). **La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madrid: Publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación observatorio Español de Acuicultura, 2009. p. 247-336.

POVH, J. A. et al. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 35, n.1, p. 5-15, 2008.

POVH, J. A. et al. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 5-15, 2008.

REDDING, J. M.; PATIÑO, R. Reproductive Systems. In: OSTRANDER, G. K. (Ed.). **The Laboratory Fish**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 261-270.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P. et al. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 56-63, 2010.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, A. M.; AGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 8-275.

ROSS, S. T.; MATTHEWS, W. J. ECHELLE, A. A. Persistence of stream fish assemblages: effects of environmental variation. **The American Naturalist**, Chicago, v. 126, n. 1, p. 26-40, 1985.

SADOVY, Y.; SHAPIRO, D. Y. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. **Copeia**, Lawrence, v. 1987, n. 1, p. 136-156, 1987.

SCHULTZ, R. J. Genetic regulation of temperature-mediated sex ratios in the livebearing fish *Poeciliopsis lucida*. **Copeia**, Lawrence, v. 1993, n. 4, p. 1148-1151, 1993.

SELIM, K. M. et al. Effects of high temperature on sex differentiation and germ cell population in medaka, *Oryzias latipes*. **Aquaculture**, Maine, v. 289, n. 3-4, p. 340-349, 2009.

SHAPIRO, D. Y. Variation of group composition and spatial structure with group size in a sex changing fish. **Animal Behavior**, Worcester, v. 36, n. 1, p. 140-149, 1988.

SIROL, R. N.; BRITTO, S. G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M. G.; HENRY, R.; JORCIN, A. **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. São Carlos: Editora RIMA, 2006. p. 275-284.

SOUZA, T. G. **Desempenho reprodutivo e diferenciação gonadal de piautês-pintas, *Leporinus friderici*, Bloch 1974**. 2015. 80 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

STRÜSSMANN, C. A.; NAKAMURA, M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, Namur, v. 26, n. 1, p. 13-29, 2002.

STRÜSSMANN, C. A. et al. Thermal Thresholds and Critical Period of Thermolabile Sex Determination in Two Atherinid Fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. **Journal of Experimental Zoology**, Austin, v. 278, n. 3, p. 167-177, 1997.

STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F.; TODA, K. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture**, Maine, v. 139, n. 1-2, p. 31-45, 1996.

UCHIDA, D. et al. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex reversal. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 137, n. 1, p. 11-20, 2004.

VALENZUELA N.; ADAMS, D. C.; JANZEN, F. J. Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined? **The American Naturalist**, Chicago, v.161, n. 4, p. 676-683.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia Ilustrado de Peixes da Bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

VAZZOLER, A. E. A. de M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysa). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 52, n. 4, p. 627-640.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996. 169 p.

VICENTINI, R. N.; ARAÚJO, F. G. Sex ratio and size structure of *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes, Sciaenidae) in Sepetiba bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 63, n. 4, p. 559-566, 2003.

WANG, L. H.; TSAI, C. I. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Experimental Zoology**, Austin, v. 286, n. 5, p. 534-537, 2000.

WELCOMME, R. L. **River fisheries**. Rome: Food and Agriculture Organization, 1985. 262 p.

WINEMILLER, K. O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**, Berlin, v. 81, n. 2, p. 225-241, 1989.

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

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, Maine, v. 33, n. 1-4, p. 329-354, 1983.

ZANIBONI FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Uruguay River. In: CAROLSFELD, J. et al. **Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status**. Ottawa: World Fisheries Trust, 2003. p. 161-194.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 19, n. 2, p. 233-240, 2006.

ZANONI, M. A. et al. Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes temperaturas durante fase de diferenciação sexual. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 455-466, 2013.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 – GUIA PARA AUTORES

Boletim do Instituto de Pesca – Instrução aos autores

Disponível em: <http://www.pesca.agricultura.sp.gov.br/publicacoes/boletim-do-instituto-de-pesca/instrucao-aos-autores>. Acesso em 16/02/2018.

### APENDICE 2 – AUTOR GUIDELINES

Journal of Fish Biology – Instructions for authors

Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1095-8649/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1095-8649/homepage/ForAuthors.html). Acesso em 16/02/2018.

### APÊNDICE 3 – AUTOR GUIDELINES

Jornal of Applied Ichthyology – Instructions for authors

Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1439-0426/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1439-0426/homepage/ForAuthors.html). Acesso em 16/02/2018.

## VITA

Éverton Luís Zardo, filho de Leonir José Zardo e Mércia Aparecida Rosman Zardo nasceu do dia 09 de fevereiro de 1989 no município de Sarandi, estado do Rio Grande do Sul.

Iniciou e concluiu o ensino fundamental na escola Irmã Lucinda Facchini, em Diamantino, estado do Mato Grosso, cidade em que foi criado. Concluiu o Ensino Médio no Instituto Santa Maria, no município de Cáceres, estado do Mato Grosso. Em 2007 ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Federal de Santa Maria, iniciando suas atividades extracurriculares no laboratório de Avicultura e posteriormente no laboratório de Cunicultura. No entanto, ao iniciar o estágio na área de Ictiologia na mesma instituição é que surgiu a paixão pela área de peixes e o interesse pela pesquisa. Ao final do período de graduação, realizou o estágio curricular em uma piscicultura comercial no município de Silveira Martins, onde adquiriu conhecimentos práticos principalmente na área de reprodução e produção de alevinos.

Em 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria sob orientação do prof. Everton R. Behr. Neste período adquiriu experiência e realizou diversas pesquisas na área de bioecologia e conservação de peixes, trabalhando principalmente com ecologia trófica, levantamento de ictiofauna e biologia reprodutiva de peixes nas bacias dos rios Vacacaí e Ibicuí.

Em 2014 ingressou no Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do prof. Danilo Pedro Streit Jr. Neste período desenvolveu inúmeras atividades dentro da UFRGS com pesquisadores de outros departamentos e outras instituições, sempre com o foco principal em reprodução de peixes nativos. Também participou da execução de projetos de pesquisa e desenvolvimento em parceria com instituições privadas do setor hidroelétrico, empresas do ramo da Aquicultura e demais Instituições de Ensino e Pesquisa.