

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

HELENA ROBATTINI CARVALHO

DESENVOLVIMENTO GONADAL DE PIRACANJUBAS (*Brycon orbignyanus*)
CRIADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Porto Alegre/RS – Brasil
Abril de 2020

HELENA ROBATTINI CARVALHO
Médica Veterinária/UFRGS

DESENVOLVIMENTO GONADAL DE PIRACANJUBAS (*Brycon orbignyana*)
CRIADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia,
na Faculdade de Agronomia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Porto Alegre/RS – Brasil
2020

CIP - Catalogação na Publicação

CARVALHO, HELENA ROBATTINI
DESENVOLVIMENTO GONADAL DE PIRACANJUBAS (*Brycon
orbignyanus*) CRIADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS /
HELENA ROBATTINI CARVALHO. -- 2020.
82 f.
Orientador: DANILO PEDRO STREIT JR.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Diferenciação Sexual. 2. Estradiol. 3.
Testosterona. 4. Razão Sexual. 5. Peixe Migratório. I.
STREIT JR, DANILO PEDRO, orient. II. Título.

Helena Robattini Carvalho
Médica Veterinária

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

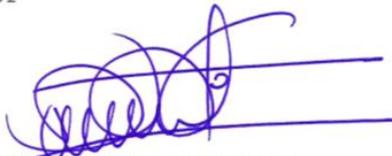
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 08.04.2020
Pela Banca Examinadora

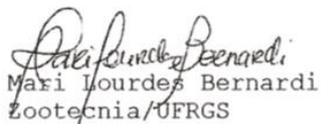


Daniilo Pedro Streit Jr.
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

Homologado em: 10/06/2020
Por



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



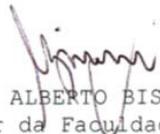
Mari Lourdes Bernardi
Zootecnia/UFRGS



Marcelo Bertolini
Dep. Med. Veterinária/ UFRGS



Eduardo Antônio Sanches
UNESP - Campus Experimental de Registro



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

DESENVOLVIMENTO GONADAL DE PIRACANJUBAS (*Brycon orbignyana*) SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS¹

Autor: Helena Robattini Carvalho

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

RESUMO: Em peixes, a razão sexual é o principal parâmetro demográfico que influencia a estrutura e a viabilidade de uma população. Este parâmetro é resultado da diferenciação sexual, que pode depender de fatores genéticos e ambientais, sendo a temperatura a principal característica ambiental a afetar este processo. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento gonadal e razão sexual de *Brycon orbignyana*. Os animais foram mantidos em três temperaturas (20, 23 e 26°C) a partir do início da alimentação exógena. Ao completarem 420 dias pós-fecundação, foram coletados dez indivíduos por tratamento, para análises histológica e hormonal das gônadas. Os resultados apontaram padrões sexuais dependentes da temperatura. Todos os animais mantidos em 20°C ainda estavam indiferenciados, tendo em suas gônadas somente células somáticas. Na temperatura de 23°C, a maioria dos animais eram machos imaturos (7/9). Em contrapartida, dos animais mantidos na temperatura mais alta (26°C), a maioria era machos em desenvolvimento (6/9). Nesta temperatura (26°C) também foram encontrados machos com gônadas em fase de regressão (2/9). Na análise hormonal, a única temperatura em que os animais possuíam estradiol presente foi em 23°C. Foi possível quantificar a testosterona nos animais dos três tratamentos. Podemos concluir que temperaturas contínuas de 23 e 26°C em cativeiro produzem uma razão sexual desequilibrada em *Brycon orbignyana* em favor do sexo masculino, assim como há um desenvolvimento gonadal acelerado na temperatura de 26°C, uma vez que os machos deste tratamento se apresentaram maduros com um ano e dois meses de idade.

Palavras-chave: diferenciação sexual, estradiol, razão sexual, peixe migratório, temperatura, testosterona,

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (81p.) Abril, 2020.

GONADAL DEVELOPMENT OF PIRACANJUBAS (*Brycon orbignyanus*) MAINTAINED IN DIFFERENTS WATER TEMPERATURE¹

Author: Helena Robattini Carvalho
Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

ABSTRACT: In fishes, sex ratio is the main demographic parameter that influences the structure and viability of a population. This parameter is the result of sexual differentiation, which depends on genetic and environmental factors, with temperature being the main environmental characteristic to affect this process. The aim of this study was to assess the effect of temperature on gonadal development and sex ratio in the *Brycon orbignyanus*. Animals were kept at three temperatures (20, 23 and 26°C) since the beginning of exogenous feeding. After 420 days following fertilization, ten individuals were collected per treatment, for histologic and steroid hormonal measurement of the gonads. The results showed a sexual pattern dependent of temperature. All animals kept at 20°C were undifferentiated, with only somatic cells in their gonads. At 23°C, most of the animals were immature males (7/9). On the other hand, among the animals kept at the higher temperature (26°C), the majority was males in development (6/9). In this temperature (26°C) males with gonads in regression phase were found too. In the hormonal assay, the only tratament where the animals had detectable estradiol was at 23°C. It was possible to quantify the testosterone in the animals of the three treatments. We can conclude that continuous 23 and 26°C temperatures favor the testicular development in *B. orbignyanus*, as well as the gonadal development is accelerated in fish farming at 26°C, once the males in this treatment had maturity with one year and two months of age.

Keywords: estradiol, migratory fish, sex ratio, sex differentiation, temperature, testosterone.

¹ Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (81p.) April, 2020.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

- Figura 1. Temperatura média mensal nas bacias dos rios Paraná e Uruguai. 13
- Figura 2. Mapa do sudeste da América do Sul, mostrando os locais onde foram observados espécimes de *Brycon orbignyanus* (quadrados brancos). 15
- Figura 3. Exemplar de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com 10 meses de idade 16
- Figura 4. Esquema da relação entre a determinação e a reversão sexual.....20
- Figura 5. Esquema representativo do controle neuroendócrino da reprodução de peixes efetuado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas24
- Figura 6. Esquema geral da espermatogênese em peixes.....26
- Figura 7. Esquema geral da oogênese em peixes28
- Figura 8. Etapas da biossíntese do estradiol no organismo32

Capítulo II

- Figura 1. Fases de maturação dos *B. orbignyanus* incubados nas três temperaturas experimentais, 20, 23 e 26°C. 45
- Figura 2. Características histológicas testicular de *B. orbignyanus*. a) Animal indiferenciado apresentando somente células somáticas de Sertoli (cabeça de seta) nos testículos. b) Macho imaturo, com a presença de espermatogônias indiferenciadas isoladas (seta). c-d) Testículos de animais em Desenvolvimento, destacando a presença de cistos de células germinativas (Sc: espermatócitos; St: espermátides; Sz: espermatozoide) e-f) Testículos em regressão. Com espermatozoides residuais (seta vazada), morte celular e desorganização tecidual (setas duplas). Asterisco representa o interstício que toma grande parte da gônada. Barras de escala: a-d,f= 50µm. e = 100µm. Inset = 10 µm. Coloração H.E. 46
- Figura 3. Características histológicas ovarianas de *B. orbignyanus*. a) Visão geral de um ovário de fêmea imatura, com poucos oócitos em crescimento primário (seta) Inset: Aumento da Imagem a, evidenciando os oócitos. b) Ovário com oócitos em crescimento primário. Barras de escala: 10µm. Coloração H.E. 47

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Descrição macroscópica e microscópica das fases do ciclo reprodutivo de machos.....27

Tabela 2. Descrição macroscópica e microscópica das fases do ciclo reprodutivo de fêmeas.....30

Capítulo II

Tabela 1. Índices zootécnicos de *B. orbignyanus* criados em diferentes temperaturas.44

Tabela 2. Análise da distribuição de machos e fêmeas de piracanjubas mantidas nos tratamentos de 23 e 26°C.44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – graus Celcius
bpm – óócito no início da prófase da primeira divisão meiótica
ca – alvéolo cortical
CA – cortical alveolar
cm – centímetro
CP – crescimento primário
DAF – dias após fertilização
E2 – estradiol
Ecl – espermátide primário
Ecll – espermátide secundário
EG – epitélio germinativo
Egl – espermatogônia primária
Egll – espermatogônia secundária
Et – espermátide
Ez – espermatozoide
FSH – hormônio folículo estimulante
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofina
IGS – índice gonadossomático
Kg – quilo
LH – hormônio luteinizante
m – mitocôndria
mc – micróplia
met I – metáfase da primeira divisão meiótica
met II – metáfase da segunda divisão meiótica
mg – miligramas
mg/L – miligramas por litro
mg/mL – miligramas por mililitro
mL – mililitro
n – núcleo
nc – nucléolo
ng/mL – nanograma por mililitro
nmd – desintegração da membrana nuclear
o – organelas
PCG – célula germinativa primordial
pg/ml – picograma por mililitro
sc – espermátide
st – espermátide
sz - espermatozoide
TSD – determinação sexual por temperatura
v – vacúolos
Vtg – vitelogenina

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Espécie modelo do estudo	15
2.2. Determinação sexual em peixes.....	19
2.2.1. Influência da temperatura na razão sexual de peixes	21
2.3. Maturação gonadal em peixes.....	23
2.3.1. Fases da maturação gonadal em machos	25
2.3.2. Fases da maturação gonadal em fêmeas	28
2.3.3. Hormônios envolvidos na maturação	31
2.3.3.1. Estradiol.....	33
2.3.3.2. Testosterona.....	34
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	36
CAPÍTULO II.....	37
Introdução.....	39
Material e métodos	40
LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO	40
MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	41
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	41
COLETA E ARMAZENAMENTO DAS GÔNADAS	41
PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA HISTOLOGIA	42
PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HORMONAL	42
<i>Princípio da determinação de testosterona e estradiol.....</i>	43
ESTATÍSTICA	43
Resultados.....	43
INDÍCES ZOOTÉCNICAS.....	43
ANÁLISE HISTOLÓGICA	44
ANÁLISE HORMONAL	47
Discussão	47
Conclusão.....	50

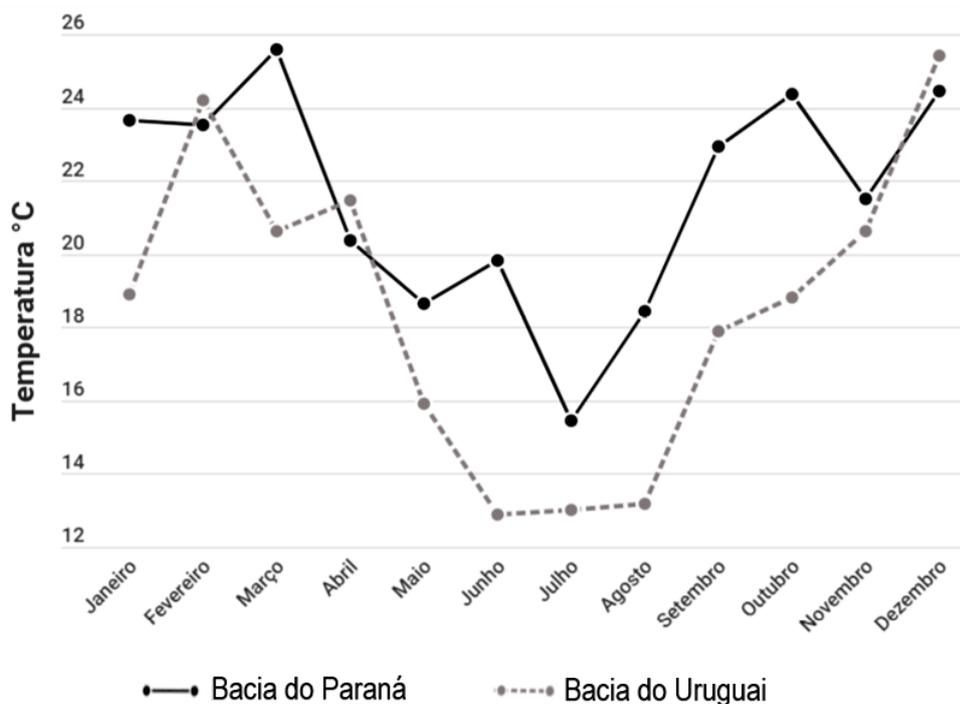
Agradecimentos.....	50
Referências	51
CAPÍTULO III.....	55
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS.....	67
VITA.....	81

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A Piracanjuba (*Brycon orbignyianus*, Valenciennes, 1850) é uma espécie apreciada pelo sabor agradável da sua carne e elevado valor nutricional, crescimento rápido, boa conversão alimentar e aceitação à ração artificial e subprodutos agroindustriais quando em cativeiro (Borba et al., 2006; Ninhaus-Silveira et al., 2006). Além disso, devido ao seu comportamento agressivo quando fisgada, ganha destaque em pescas esportivas, o que torna sua produção uma atividade rentável. Esta espécie possui hábito alimentar onívoro e, assim como outros Briconíneos, realiza piracema nos meses chuvosos (Castagnolli, 1992). No meio ambiente, pode ser encontrada nas bacias dos rios Paraná e Uruguai (Reis et al., 2003), que possuem temperaturas mínimas de 18,43° e 12,9°C, e máximas de 25,57° e 25,42°C, respectivamente (Figura 1; ANA, 2020). Porém, encontra-se em perigo de extinção (ICMBio, 2018), devido a alterações ambientais causadas por ações humanas, como a redução da fonte de alimento natural pelo desmatamento, pesca predatória, contaminação da água, construção de barragens hidrelétricas, entre outras (Paiva, 1982; Agostinho et al., 2005; Lopera-Barrero, 2009).

Figura 1. Temperatura média mensal nas bacias dos rios Paraná e Uruguai.



Fonte: adaptado de ANA (2020).

A redução da população da piracanjuba na natureza estabelece a necessidade de atividades voltadas à conservação e reintrodução da espécie em seus locais de origem. Diante disso, protocolos no âmbito reprodutivo e na produção consciente de juvenis de piracanjuba devem ser estudados, a fim de auxiliar na eficácia da produção do animal em cativeiro. De acordo com Agostinho et al. (2005), os programas de repovoamento de peixes no Brasil têm sido utilizados há mais de três décadas. Porém, o monitoramento dos resultados geralmente é inadequado ou ausente. Como consequência, numerosas técnicas errôneas de manejo continuam a ser aplicadas, fazendo com que os projetos sejam desenvolvidos com base em sistemas falhos. Alguns critérios merecem atenção nos programas de repovoamento e, segundo Piferrer (2009), a razão sexual entre machos e fêmeas de uma população a ser reintroduzida é um dos aspectos mais importantes, pois é um parâmetro ecológico basal, que tem influência direta na estrutura populacional, no potencial reprodutivo e, conseqüentemente, na sobrevivência e propagação da espécie.

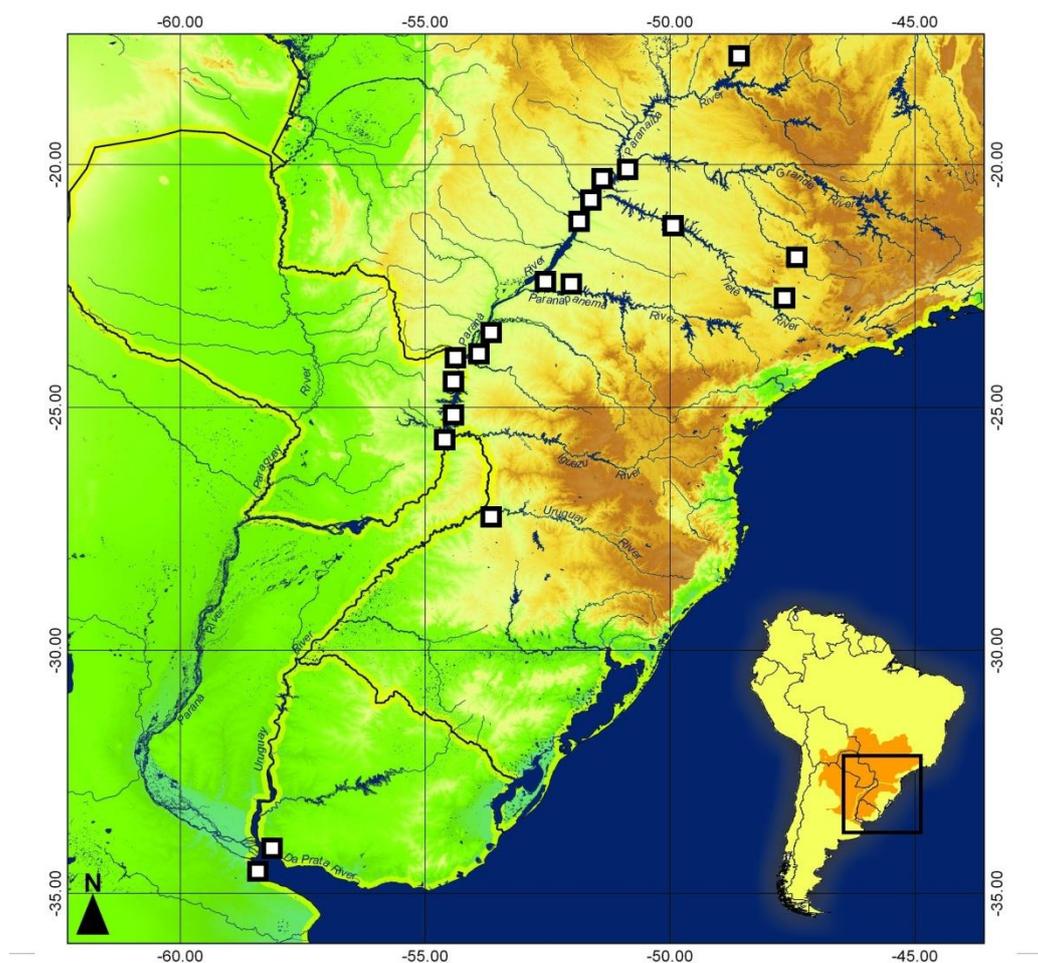
Em cativeiro, tem se observado de forma empírica uma desproporção entre machos e fêmeas de piracanjuba, o que pode ser tornar um problema quando estes animais são utilizados em programas de repovoamento, uma vez que a redução no número de indivíduos de um dos sexos pode diminuir a população, gerando um efeito gargalo decorrente de uma seleção que não pode ser considerada natural (Beiguelman, 2008). Com isso, a fim de permitir a sobrevivência e fixação da população no local de soltura, há necessidade de elaboração de estratégias reprodutivas para a manipulação sexual das larvas e alevinos que serão reintroduzidos nos ambientes naturais (Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Panarari-Antunes et al., 2011). Dentre estes manejos, a manipulação sexual pelo controle da temperatura em determinadas fases do desenvolvimento dos peixes vem se mostrando eficiente em várias espécies, sendo considerada de alta aplicabilidade e sem restrições ambientais. Sendo assim, pode ser utilizada como ferramenta para produção de indivíduos monossexo, geralmente com fins produtivos, ou para produção de populações sexualmente equilibradas, com fins conservacionistas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Espécie Modelo do Estudo

A piraicanjuba (*Brycon orbignyianus*) é uma espécie de peixe com ampla distribuição geográfica (Figura 2), encontrada principalmente nas bacias dos rios Paraná e Uruguai (Castagnolli, 1992), popularmente conhecida como pirá-pirá, piraicanjuba, pirápitanga, salmón-del-Paraná, salmón-del-rio ou salmonete (Argentina), piraputá (Uruguai), piraicanjuva, bracanjuva, bracanjuba, pracanjuva, pirapitonga, piraputanga ou salmão-crioulo (Brasil) (Milliorini, 2012).

Figura 2. Mapa do sudeste da América do Sul, mostrando os locais onde foram observados espécimes de *Brycon orbignyianus* (quadrados brancos).



Fonte: adaptado de Lima (2017).

A espécie foi caracterizada por Lima (2017) como um peixe de escamas, alongado e robusto, com boca relativamente ampla e dentes molariformes. O mesmo autor ainda relatou que, no geral, sua coloração é prateada, apresentando o dorso cinza escuro, assim como o topo da cabeça. Uma listra escura médio-lateral se estende através do pedúnculo caudal, e os raios da nadadeira caudal são dorsais e ventrais a esta listra, apresentando coloração avermelhada a vermelha intensa. As nadadeiras anal, dorsal e pélvica também apresentam coloração avermelhada, porém, as nadadeiras peitorais são alaranjadas ou escuras (Figura 3).

Figura 3. Exemplar de piracanjuba (*Brycon orbignyianus*) com 10 meses de idade.



Fonte: próprio autor (2018).

De acordo com Vaz (2000), essa espécie possui hábito alimentar onívoro, consumindo frutos, sementes, insetos e peixes. Em relação à reprodução, possui uma estratégia reprodutiva do tipo periódica (Winemiller, 1989). Neste caso, apresenta desova total e sazonal, primeira maturação tardia, alta fecundidade, ovos pequenos, baixo investimento parental e reprodução sincrônica por grupos, em um período favorável do ano (cheia), após a realização da migração (Vazzoler & Menezes, 1992). Características ligadas à reprodução se mostram distintas entre as populações do rio Uruguai e do alto Paraná. Assim, no rio Uruguai a maturidade sexual é alcançada no primeiro e segundo anos de vida para machos e fêmeas, respectivamente (Zaniboni-Filho et al., 2004), enquanto no alto rio Paraná ela é atingida no segundo e terceiro,

com um tamanho médio de 30 cm (Vazzoler et al., 1996). A direção dos movimentos reprodutivos também é oposta, sendo descendente no rio Uruguai e baixo Paraná (Devincenzi & Teague, 1942; Ringuelet et al., 1967) e ascendente no alto Paraná (Agostinho et al., 2003). Um dimorfismo sexual entre os indivíduos adultos é manifestado pela presença de ganchos nos raios da nadadeira anal nos machos (Zaniboni-Filho et al., 2004). As migrações reprodutivas da espécie eram registradas entre setembro e janeiro nos rios Mog-GUAçu e Piracicaba (Ihering, 1929; Magalhães, 1931; Godoy, 1975), sendo mais intensa em dezembro e janeiro.

De acordo com o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção publicado pelo ICMBio (2018), a piracanjuba está na lista de peixes em perigo (EN), enfrentando um risco muito alto de extinção na natureza. Esta redução populacional é um fato histórico já registrado nos anos 80 por Paiva (1982), posteriormente reafirmado por Agostinho et al. (2005), quando ambos relacionaram o acontecimento às ações antropogênicas, como o desmatamento e assoreamento dos rios, redução das fontes de alimento, poluição, construção de barragens hidrelétricas que impossibilitam as migrações reprodutivas da espécie e, principalmente, pela pesca e captura excessiva da piracajuba. Ashikaga et al. (2015) comprovaram que espécimes de piracanjubas estão estruturados em diferentes subpopulações na bacia do Rio da Prata, onde áreas com melhores condições ambientais apresentaram os subgrupos com maiores taxas de variabilidade genética, dando ênfase para a importância de futuras ações conservacionistas.

Pontuando os fatos citados anteriormente, de que a piracanjuba leva no mínimo dois e três anos para atingir a maturidade sexual (machos e fêmeas, respectivamente), e que a espécie está em alto risco de extinção, algumas estratégias têm sido adotadas para a reprodução e conservação da espécie. Dentre estas estratégias empregadas, destacam-se o transplante de células germinativas primordiais (Silva et al., 2019), a criopreservação espermática (Maria et al., 2006), o resfriamento de embriões (Paes et al., 2014) e a vitrificação de tecido ovariano (Marques et al., 2016) e o uso de bancos de germoplasma (Martínez-Páramo et al., 2017).

Apesar de encontrarmos numerosos estudos sobre a fisiologia de peixes, poucos utilizam piracanjubas como modelo para este critério. A literatura existente aborda sobre as individualidades reprodutivas da espécie, mas não aponta os fatores que influenciam em algumas destas características. Após analisar 307 exemplares, Zardo (2018) relatou uma desproporcionalidade na razão sexual da piracanjuba, dividindo a amostragem em nove classes de comprimento total, variando entre 3,6 e 40,4cm. Uma frequência maior de machos foi observada nas classes intermediárias (classe 6: $24,1 \leq 28,1$ cm; classe 7: $28,2 \leq 32,2$ cm; classe 8: $32,3 \leq 36,3$ cm), chegando a 3,3 machos para cada fêmea na classe 8. Isto se torna um problema, pois, segundo Piferrer (2009), a razão sexual entre machos e fêmeas de uma população a ser reintroduzida é um dos aspectos mais importantes, uma vez que a redução no número de indivíduos de um dos sexos pode diminuir a população, gerando um efeito *bottleneck* decorrente de uma seleção não natural (Beiguelman, 2008).

Dando importância ao melhor modelo de manejo e manutenção da variabilidade da progênie de piracanjubas para programas de repovoamento, Castro (2015) comparou os sistemas de extrusão e seminatural, concluindo que, a variabilidade foi mantida em acasalamentos de uma fêmea para três machos e duas fêmeas para seis machos. Neste caso, o autor concluiu pela existência de relações de dominância reprodutiva nos dois sistemas, influenciando na participação desigual dos machos, sendo que os tratamentos por extrusão apresentaram contribuição mais homogênea. Por outro lado, o autor relatou melhores taxas de fecundação, eclosão e mortalidade dos reprodutores no sistema seminatural, resultado este associado às lesões causadas pela massagem abdominal na extrusão. Desta forma, o estudo indicou a redução da proporção macho x fêmea na produção de alevinos de piracanjubas no sistema seminatural em pisciculturas voltada ao repovoamento, a fim de reduzir ao máximo o comportamento de dominância, reafirmando a importância de uma razão sexual mais equilibrada.

O potencial da piracanjuba em programas de repovoamento foi pontuado por Di Chiacchio et al. (2017), que relacionaram a propagação artificial para sua conservação e manejo. Neste estudo, os autores avaliaram a qualidade espermática da espécie após o processo de congelamento, concluindo que os piscicultores podem congelar o

esperma de *B. orbignyana* em qualquer momento da temporada de reprodução, pois não houve mudanças significativas nas características seminais da espécie após o congelamento. Outro estudo visando a melhora produtiva da espécie em pisciculturas foi realizado por Sgnaulin et al. (2018), que submeteram a piracanjuba a um sistema de bioflocos. Os autores concluíram que a tecnologia de bioflocos pode ser utilizada no cultivo de piracanjuba, embora este sistema não tenha apresentado melhores resultados de crescimento e sobrevivência quando comparado a um sistema de recirculação aquícola.

Levando em conta a diminuição dos espécimes de *B. orbignyana* na natureza e a consequente perda da variabilidade genética e maior vulnerabilidade da espécie, Castro et al. (2017) revelaram a possibilidade da utilização de *primers* de diferentes espécies e gêneros em piracanjubas, facilitando a realização de estudos genéticos nessa espécie. Também dando importância a este conceito, Castro et al. (2019) avaliaram a variabilidade genética de alevinos em relação a larvas, averiguando possíveis gargalos genéticos e mudanças na variabilidade ao longo do período de cultivo. Os autores chegaram à conclusão de que os estoques de larvas e alevinos demonstraram adequada variabilidade, porém, os valores positivos no coeficiente de endogamia e a existência de gargalo genético na fase de alevino atentam para o risco de declínio de variabilidade genética, reforçando a necessidade de constantes monitoramentos genéticos antes da liberação desses indivíduos no ambiente natural.

2.2. Determinação Sexual em Peixes

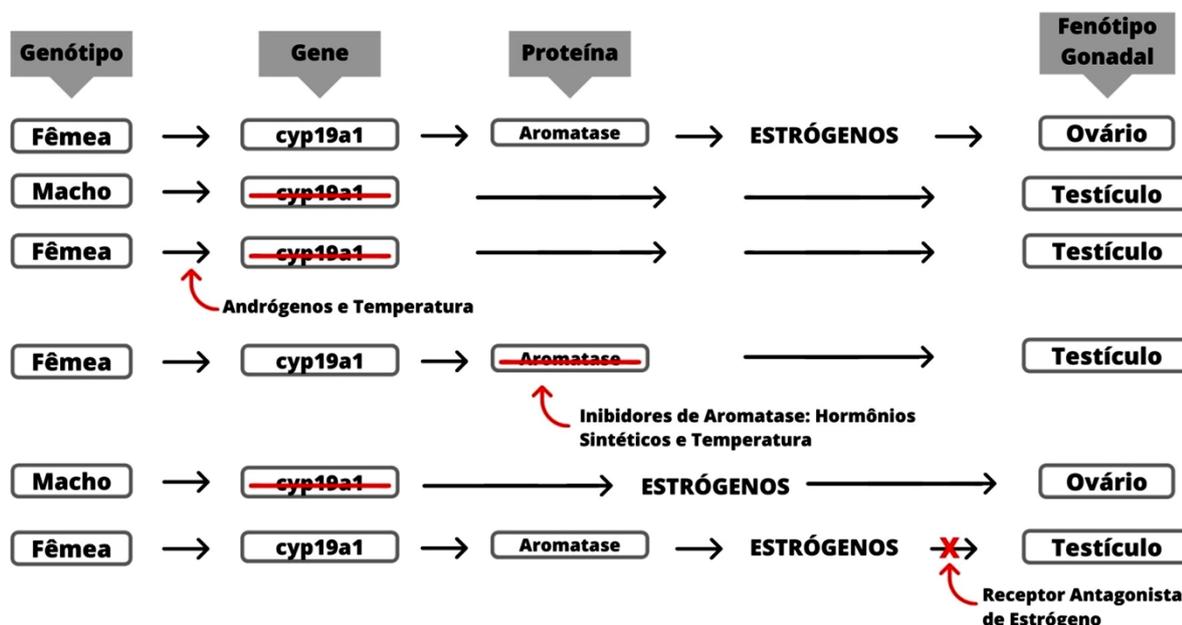
Em peixes, há uma grande variedade de fatores responsáveis pela determinação do sexo e pela formação de padrões de diferenciação sexual. Dentre eles, destacam-se a base genética (com os sistemas monogênico e poligênico), a influência de diferentes fatores ambientais (como a temperatura e as interações sociais), ou ainda a combinação de ambos mecanismos. (Costa et al., 2013). Em consequência da determinação sexual, o processo de diferenciação sexual irá direcionar a formação das gônadas masculinas ou femininas em cada indivíduo.

Assim como nos mamíferos, uma gônada indiferenciada precede o desenvolvimento de ovários e testículos nos peixes. No entanto, Almeida (2013) relata

que, nos teleósteos, a diferenciação sexual é um processo plástico, cujos eventos moleculares e celulares envolvidos variam muito entre as espécies, resultando em mediações hormonais distintas dos mamíferos, com particularidades diversas. Basicamente dois tipos de diferenciação ocorrem nos peixes bissexuados: a) *diferenciação direta*, quando, a partir da gônada indiferenciada forma-se diretamente um ovário ou um testículo; b) *diferenciação indireta*, quando em todos os indivíduos da espécie ocorre a formação de ovários e, mais adiante, em metade dos animais, esses ovários se diferenciam em testículos.

O esquema representado na Figura 4 elucidada a relação entre a determinação sexual e a reversão sexual. De acordo com Vernetti et al. (2012), a rota normal do desenvolvimento ovariano envolve a transcrição do gene *Cyp19a1* e a produção da proteína aromatase, que irão atuar na síntese dos estrógenos e desenvolvimento ovariano.

Figura 4. Esquema da relação entre a determinação e a reversão sexual.



Fonte: adaptado de Vernetti et al. (2012).

Em machos genotípicos, o gene *Dmrt-1* tem capacidade de se ligar diretamente à região promotora do gene *Cyp19a1*, bloqueando a transcrição do mesmo e levando

ao desenvolvimento testicular. Em fêmeas, o uso de andrógenos impede a síntese do gene *Cyp19a1* e promove o desenvolvimento testicular, o mesmo ocorre quando inibidores de aromatase são utilizados. Em machos, o bloqueio da síntese do gene *Cyp19a1* e o uso de estrógenos acarreta em desenvolvimento ovariano. Em fêmeas, mesmo ocorrendo a síntese da aromatase e a produção de estrógenos, o uso de receptores inibidores de estrógeno (antagonistas) leva ao desenvolvimento testicular.

Segundo Cotton & Wedekind (2008), quando a determinação do sexo em uma espécie é predominantemente genética, mas ambientalmente reversível, a exposição de mudanças no ambiente (antropogênicas ou não) pode levar a alterações na proporção do sexo de uma população. Por exemplo, temperaturas abaixo ou acima do normal durante o desenvolvimento larval podem levar a um desequilíbrio entre machos e fêmeas de diversas espécies (Wallace et al, 1999; Devlin & Nagahama 2002). Portanto, a razão sexual pode ser influenciada por alguns fatores ambientais, e, de acordo com Baroiller & Cotta (2001), a temperatura parece ser o principal fator determinante do sexo.

2.2.1. Influência da Temperatura na Razão Sexual de Peixes

Embora a razão sexual dos peixes neotropicais geralmente ser de 1:1 (Lowe-McConnell, 1987), Vazzoler (1996) afirma que algumas alterações nas proporções podem ocorrer, indicando, por exemplo, o predomínio de machos ou fêmeas em diferentes classes de comprimento ou em épocas distintas de estudos. Levando em consideração a determinação sexual por temperatura, Baroiller & Cotta (2001) relatam que, na maioria das espécies termosensíveis (alguns atherinídeos, poecilídeos e ciclídeos), a razão entre machos e fêmeas aumenta com a temperatura. Inversamente, em algumas raras espécies (robalo europeu *Dicentrarchus labrax*, bagre americano *Ictalurus punctatus*), altas temperaturas podem produzir razões sexuais tendendo para as fêmeas e/ou baixas temperaturas promovem populações com um maior número de machos. Em alabote japonês *Paralichthys olivaceus*, tanto temperaturas altas quando as baixas induzem a populações monossexo masculinas, enquanto temperaturas intermediárias produzem uma razão sexual de 1:1.

A maior ocorrência de machos pelo aumento da temperatura está relacionada com uma maior concentração de cortisol circulante, glucocorticoide que está diretamente relacionado com a diferenciação sexual e com mecanismos de respostas ao estresse. Em temperaturas elevadas, existe um aumento dos níveis plasmáticos de cortisol, responsável pela supressão da expressão do gene *Cyp19a*, inibindo a síntese da aromatase e, portanto, a síntese de estradiol (Almeida, 2013). Em estudo utilizando medaka *Oryzias latipes* como modelo, Hayashi et al. (2010) sugerem que altas temperaturas (32-34°C) induzem a masculinização de fêmeas genotípicas (XX) pela elevação do nível de cortisol, que causa a supressão da proliferação das células germinativas e da expressão do receptor de hormônio foliculo estimulante mRNA.

Populações com razões sexuais que são altamente influenciadas pelo ambiente podem reduzir consideravelmente seu tamanho, devido à limitação de respostas evolutivas da espécie. Caso ocorra a perda de determinação sexual genética, este grupo pode se extinguir rapidamente, caso as forças ambientais que determinam sua determinação gonadal sejam cessadas (Cotton & Wedekind, 2008).

As mudanças climáticas, principalmente em decorrência das ações antropogênicas, têm sido causas de impactos ambientais a nível regional e global. Tais efeitos induzem ao aumento da temperatura, que é um fator de extrema importância para os processos biológicos e ecológicos nos peixes, tais como crescimento, reprodução, desenvolvimento e migração (Amaral & Vale, 2011). Em nível fisiológico, o aumento da temperatura modifica o funcionamento de diversas proteínas responsáveis pela sinalização celular, homeostase, osmorregulação, defesas das células e transcrição gênica nos peixes, além da diminuição da taxa de crescimento e elevação nos níveis de cortisol (Lima, 2016; Oliveira & Val, 2017), o que implicaria em um desequilíbrio entre machos e fêmeas em espécies com determinação sexual dependente da temperatura. Os efeitos decorrentes das mudanças climáticas podem ser ainda mais severos para espécies ameaçadas, como a piracanjuba.

Do ponto de vista produtivo, é conveniente a manipulação da determinação sexual do lote a ser produzido. Segundo Reis et al. (2016), pode haver uma agregação de valor ao produto se forem produzidos somente indivíduos do sexo com

superioridade zootécnica. Na maioria dos peixes, as fêmeas representam o gênero mais rentável (Beardmore et al., 2001), geralmente por apresentarem puberdade mais tardia que os machos. Já a criação de lotes masculinos é praticada com várias espécies, como por exemplo, na tilapicultura. Gêneros que são altamente prolíferos nos tanques de piscicultura geram lotes desuniformes. Como os machos apresentam crescimento mais rápido que as fêmeas, os lotes exclusivos de machos não só evitam a reprodução indesejada, como aumentam a produção (Bombardelli et al., 2007; Zanoni et al., 2013).

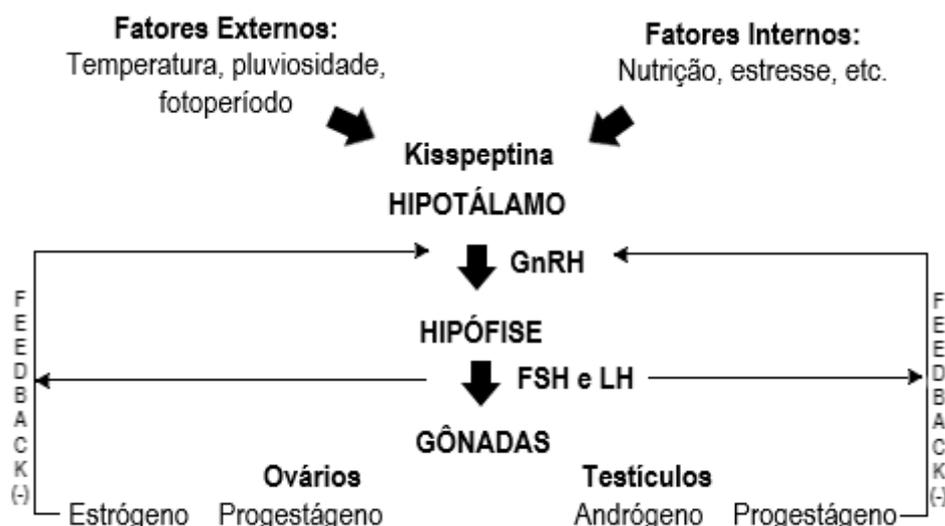
2.3. Maturação Gonadal em Peixes

De acordo com Trudeau (2006), de um modo geral, os animais dispõem de um sistema que recebe as informações procedentes do ambiente externo (sinais ambientais) e internos (eventos fisiológicos), as integram, regulam, e resultam em um estado endócrino que desencadeia os eventos fisiológicos que conduzirão para uma reprodução bem sucedida. A grande maioria dos peixes possui o processo reprodutivo modulado pelos fatores ambientais, como temperatura, fotoperíodo, pluviosidade, dentre outros parâmetros. No entanto, para Honji & Moreira (2017), as múltiplas e complexas interações hormonais entre os órgãos sensoriais e os reprodutivos, associadas ao evento da reprodução, são proporcionadas endogenamente por um sistema neuroendócrino, envolvendo fundamentalmente a participação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Figura 5).

O processo de desencadeamento da liberação das gonadotropinas em peixes é descrito por Baldisseroto et al. (2014), que coloca a kisspeptina no centro da coordenação dos estímulos externos e dos fatores internos, que, por sua vez, é produzida por neurônios hipotalâmicos. Ao ser estimulado pela kisspeptina, o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) estimula a liberação das duas gonadotropinas: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pelas células gonadotrópicas da hipófise. As gonadotropinas atuam nas gônadas feminina e masculina, estimulando o desenvolvimento dos gametas e produção de hormônios esteróides sexuais (andrógenos, estrógenos e progestágenos). Os esteróides, por sua

vez, atuam nas próprias gônadas e participam também do *feedback* negativo no processo, controlando a parte superior do eixo.

Figura 5. Esquema representativo do controle neuroendócrino da reprodução de peixes efetuado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.



Fonte: Adaptado de Baldisserotto et al., 2014.

Segundo Baldisserotto (2014), a época da desova e o tamanho do animal na primeira maturação sexual são parâmetros importantes da biologia reprodutiva de peixes, porque fornecem subsídios para a normatização da pesca, especialmente de espécies de importância comercial. O comprimento do peixe na primeira maturação sexual é comumente determinado pelo método L_{50} , que estabelece o comprimento no qual 50% dos indivíduos amostrados são adultos e 50% são imaturos ou juvenis. O método L_{100} indica o tamanho no qual todos os exemplares são adultos e aptos à reprodução, sendo este parâmetro importante para os procedimentos de reprodução induzida nas pisciculturas.

Em estudo recente, Zardo (2018) coletou e analisou microscopicamente as gônadas de piracanjubas em todas as estações do ano, até os animais completarem 730 dias após a fecundação (DAF). As análises mostraram que não houve alterações

significativas nos padrões morfológicos das gônadas da piracanjuba antes dos 296 DAF. Apesar de não ter ficado claro que a diferenciação ovariana ocorreu antes da testicular na espécie, o autor não descartou esta possibilidade, uma vez que o percentual de indivíduos em diferenciação testicular e ovariana foi o mesmo aos 323 DAF, sendo que, na coleta seguinte (365 DAF), o percentual de indivíduos em diferenciação testicular aumentou, sugerindo que uma parte dos animais indiferenciados aos 323 DAF iria desenvolver testículos mais tarde. Em conclusão, a pesquisa relatou que aos 730 DAF todos os indivíduos já estavam diferenciados em macho ou fêmea. Não foram observados animais indiferenciados maiores que 27 cm, indicando que este é o tamanho mínimo para a espécie completar o processo de diferenciação sexual e formação do tecido gonadal.

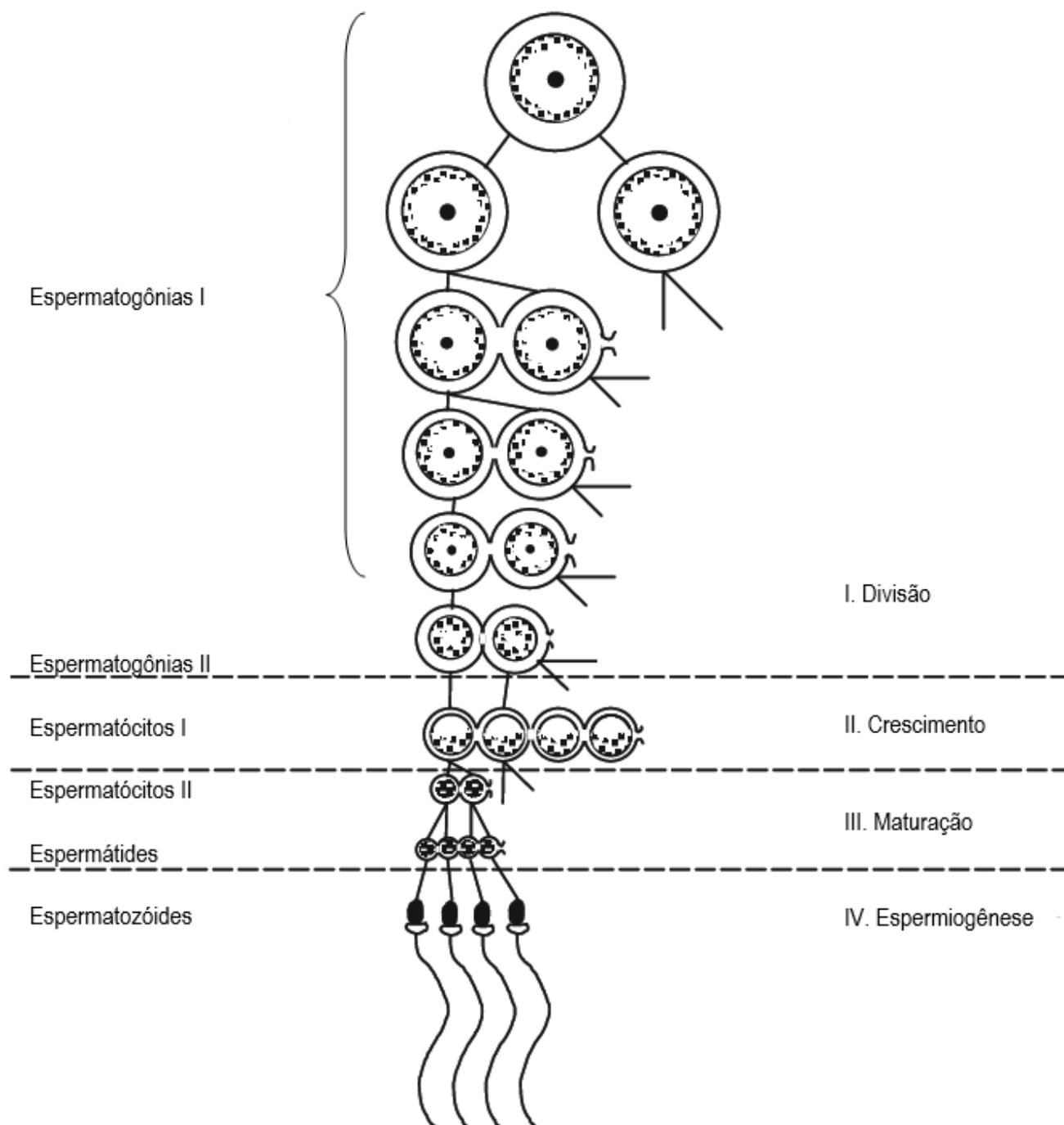
2.3.1. Fases da Maturação Gonadal em Machos

A espermatogênese nos vertebrados em geral, assim como nos teleósteos, é um processo complexo que pode ser definido como um evento de proliferação celular, em que as espermatogônias se multiplicam, seguido por modificações celulares resultantes da ativação da maquinaria de divisão celular meiótica e posterior diferenciação das células filhas em espermatozoides (Baldisserotto et al., 2014).

Pavlov & Emel'yanova (2016) dividiram o desenvolvimento das células sexuais masculinas em quatro períodos: (I) Divisão; (II) Crescimento; (III) Maturação; e (IV) formação do espermatozoide ou espermiogênese (Figura 6). A primeira fase se inicia com divisões mitóticas da espermatogônia primária, que foi originada de células germinativas primordiais (PCG's). Algumas das espermatogônias não irão sofrer a clivagem, sendo estas as maiores células nos testículos. Outras, irão se dividir inúmeras vezes, diminuindo seu tamanho e se transformando em espermatogônias de ordens subsequentes. A última divisão mitótica conduz à formação das espermatogônias II, caracterizadas por uma duplicação pré-meiótica do DNA. Estas células entram na prófase da primeira divisão meiótica, levando ao aparecimento de espermatócitos primários, indicando o início do próximo período de desenvolvimento (II. crescimento). Durante a fase seguinte (III. maturação), a primeira divisão meiótica é finalizada, formando espermatócitos secundários haplóides. Após a segunda divisão

meiótica, as espermatídes começarão a surgir. Durante o período de espermiogênese (IV), um espermatozoide é formado a partir de cada espermatíde, desfazendo as pontes citoplasmáticas que uniam estas células e eliminando a disposição em cistos.

Figura 6. Esquema geral da espermatogênese em peixes.



Fonte: adaptado de Pavlov & Emel'yanova (2016).

A observação das características microscópicas e macroscópicas que os testículos dos teleosteos apresentam permite a distinção da fase reprodutiva que o animal se encontra. Certas espécies podem possuir suas particularidades, porém, a nomenclatura utilizada para indicar cada período reprodutivo deve ser compreendida universalmente. Brown-Peterson et al. (2011) estabeleceram um compilado com a terminologia mais utilizada para cada fase do desenvolvimento gonadal em peixes, mencionando as individualidades de cada uma (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição macroscópica e microscópica das fases do ciclo reprodutivo de machos.

Fase	Características macroscópicas e histológicas
Imaturo	Testículos pequenos, muitas vezes claros e filiformes. Formação inicial dos lóbulos testiculares, que contém apenas espermatogônias (principalmente Egl, mas algumas EgII). Os lóbulos não possuem lúmen e a proliferação espermatogonial na forma de divisão mitótica é o único tipo de atividade da espermatogênese que está em andamento.
Desenvolvimento	Testículos pequenos, mas facilmente identificados. EG contínuo com espermatocistos evidentes ao longo dos lóbulos, apresentando espermatogênese ativa. EgII, Ecl, EclI, Et e Ez podem estar presentes nos espermatocistos. Ez não estão presentes no lúmen dos lóbulos ou ductos espermáticos.
Apto à liberação	<p><i>Subfase de desenvolvimento inicial:</i> apenas Egl, EgII e Ecl. Testículos grandes e firmes. Ez presentes nos lóbulos/túbulos seminíferos e/ou ductos espermáticos. Todas as fases da espermatogênese podem estar presentes. Espermatocistos ao longo do testículo, com espermatogênese ativa. EG pode ser contínuo ou descontínuo. <i>Subfase de liberação ativa</i> (macroscópica): liberação de sêmen com leve pressão no abdômen.</p> <p>Subfases histológicas baseadas na estrutura do EG: <i>EG inicial:</i> EG contínuo ao longo de todo o testículo. <i>EG intermediário:</i> EG contínuo no ducto espermático. <i>EG final:</i> EG descontínuo em todos os lóbulos ao longo dos testículos.</p>
Regressão	Testículos pequenos e flácidos, sem liberação de sêmen com pressão. Ez residuais presentes no lúmen dos lóbulos e nos ductos espermáticos. Espermatocistos amplamente dispersos perto da periferia contendo EclI, Et e Ez. Pouca ou nenhuma espermatogênese ativa. Proliferação espermatogonial e regeneração do EG comum na periferia dos testículos.
Regeneração	Testículos pequenos, muitas vezes filiformes. Sem espermatocistos. Lúmen do lóbulo geralmente não aparece. Proliferação espermatogonial ao longo do testículo e EG contínuo. Pequena quantidade de Ez residual ocasionalmente presente no lúmen dos lóbulos e ducto espermático.

EG = epitélio germinativo; Ecl = espermatócito primário; EclI = espermatócito secundário; Egl = espermatogônia primária; EgII = espermatogônia secundária; Et = espermatíde; Ez = espermatozoide

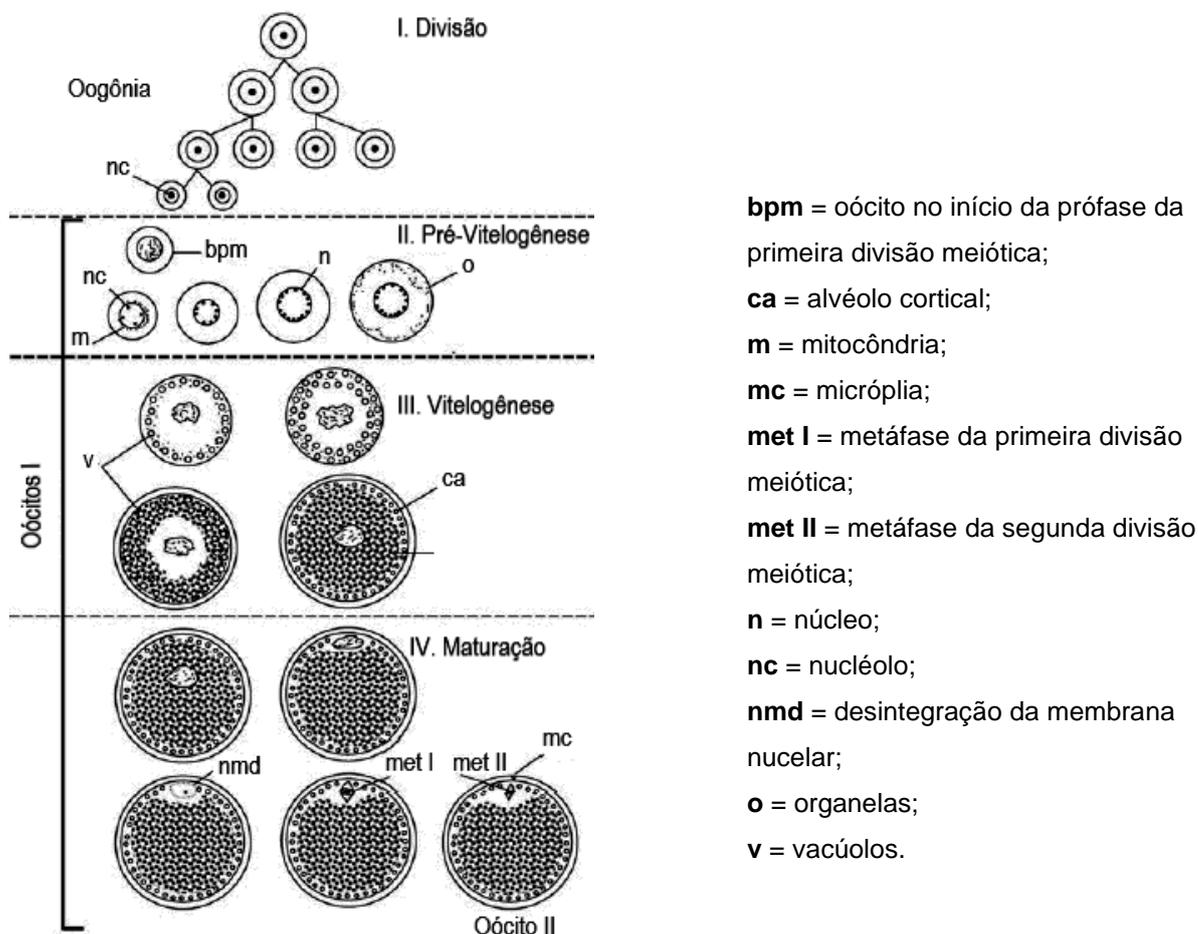
Fonte: adaptado de Brown-Peterson et al. (2011).

2.3.2. Fases da Maturação Gonadal em Fêmeas

Com relação às espécies nativas sul-americanas, a maior parte delas são migradoras e apresentam mecanismo de desenvolvimento oocitário “sincrônico em dois grupos” e desova do tipo total (Baldisserotto et al., 2014), como é o caso da piracanjuba. Em geral, ovários deste tipo apresentam dois lotes de oócitos: um apresenta células maduras, que serão utilizadas na próxima desova; e o outro apresenta oócitos pré-vitelogênicos, que devem ser recrutados para a estação reprodutiva seguinte (Baldisserotto et al., 2014).

Em peixes, a oogênese inclui quatro períodos: (I) divisão; (II) pré-vitelogênese; (III) vitelogênese; e (IV) maturação. Cada período é caracterizado por uma condição morfofisiológica das células sexuais (Figura 7; Pavlov & Emel'yanova, 2016).

Figura 7. Esquema geral da oogênese em peixes.



Fonte: adaptado de Pavlov & Emel'yanova (2016).

Nas fêmeas, a gametogênese tem início no epitélio das lamelas ovarianas, a partir das oogônias (Grier, 2002). A oogônia A indiferenciada tem uma distribuição descontínua no epitélio germinativo. De acordo com Quagio-Grassiotto et al. (2011), a mitose dessas oogônias indiferenciadas garante a produção contínua dos gametas dos peixes teleósteos, sendo as oogônias resultantes destas divisões mitóticas progressivamente envoltas pelas células pré-foliculares, formando cistos. Dentro dos cistos, as agora oôgonias B diferenciadas dividem-se por mitose, formando um conjunto de células interconectadas, denominado de cisto da linhagem germinativa (Pepling et al., 1999). Após um determinado número de ciclos mitóticos, ainda no interior dos cistos, as oogônias B diferenciadas entram em meiose, dando origem aos oócitos, os quais permanecem interconectados por pontes citoplasmáticas (Quagio-Grassiotto et al., 2011).

A meiose progride e estaciona em diplóteno tardio, quando as pontes citoplasmáticas são quebradas pelas células pré-foliculares, com consequente individualização dos oócitos, originando os folículos ovarianos (Quagio-Grassiotto et al., 2011). É no interior dos folículos que os oócitos se desenvolvem, acumulam vitelo e maturam (Quagio-Grassiotto et al., 2009; Nakamura et al., 2010). A meiose é retomada no final da maturação e só se completa com a fecundação. A ovulação ocorre pelo local da membrana basal compartilhado pelo folículo ovariano e pelo epitélio lamelar.

Em comparação com os machos, o epitélio germinativo que margeia as lamelas ovarianas é sempre descontínuo ao longo do ciclo reprodutivo das fêmeas, uma vez que as oogônias encontram-se dispersas no epitélio lamelar, bem como os sítios resultantes da sua proliferação por mitose e entrada em meiose. Os agregados celulares que se formam nesses sítios de proliferação são conhecidos como ninhos, e neles podem conviver oogônias indiferenciadas, cistos contendo oogônias diferenciadas e aqueles contendo oócitos profásicos iniciais. Consequentemente, as fases reprodutivas nas fêmeas são definidas principalmente com base nas fases do desenvolvimento oocitário, como descrito na Tabela 2 (Taylor et al., 1998; Brown-Peterson et al., 2011).

Tabela 2. Descrição macroscópica e microscópica das fases do ciclo reprodutivo de fêmeas.

Fase	Características macroscópicas e histológicas
Imaturo	Ovários pequenos, muitas vezes claros, vasos sanguíneos indistintos. Presença apenas de oogônias e oócitos pré-vitelogênicos em CP. Ausência de atresia ou feixes musculares. Parede ovariana fina e pequeno espaço entre os oócitos.
Desenvolvimento	Ovários em expansão, vasos sanguíneos começam a ser mais evidentes. Presença de oócitos em CP, com alvéolos corticais e em início de vitelogênese presentes. Não há evidência de complexo folicular pós-ovulatório ou oócitos completamente desenvolvidos. Alguma atresia pode estar presente. <i>Subfase de desenvolvimento inicial:</i> apenas oócitos em CP e CA.
Apto à desova	Ovários grandes, vasos sanguíneos proeminentes. Oócitos individuais visíveis macroscopicamente. Presença de oócitos vitelogênicos finais/completamente desenvolvidos. Algumas atresias e folículos desovados tardiamente podem estar presentes. Fases iniciais da maturação oocitária podem estar presentes. <i>Subfase de desova ativa:</i> presença de oócitos em maturação final, ovulando ou folículos pós-ovulatórios.
Regressão	Ovários flácidos, vasos sanguíneos proeminentes. Folículos e complexo folicular pós-ovulatório presentes. Presença de alguns oócitos vitelogênicos e/ou com alvéolos corticais.
Regeneração	Ovários pequenos com parede espessa e vasos sanguíneos reduzidos, mas presentes. Apenas oôgonia e oócitos em CP. Pode haver presença de feixes musculares, vasos sanguíneos ampliados, parede ovariana fina e/ou atresia e degeneração de complexos foliculares pós-ovulatórios.

CA = alvéolo cortical; CP = crescimento primário.

Fonte: adaptado de Brown-Peterson et al. (2011).

As alterações morfológicas dos ovários de *B. orbignyana* foram estudadas por Ganeco et al. (2001) durante o ciclo reprodutivo. Os autores denominaram os oócitos encontrados como:

a) Cromatina-nucléolo (fase I): menores células encontradas; apresentavam núcleo central com nucléolo único, excêntrico e basófilo. Geralmente mostravam-se agrupados em ninhos.

b) Perinucleolar (fase II): núcleo central, com vários nucléolos periféricos. O citoplasma apresentou contorno anguloso e basofilia, dependendo do seu tamanho. Estes oócitos foram observados em todas as fases de desenvolvimento.

c) Alvéolo-cortical (fase III): núcleo central, citoplasma com afinidade tintorial do basófilo para o acidófilo na periferia, presença de membrana pelúcida e células foliculares. Os autores observaram a disposição periférica e evidente de estruturas claras com fina granulação, denominadas alvéolos corticais.

d) Vitelogênico (fase IV): apresentaram o envoltório folicular e delgada camada de alvéolos corticais. Os grânulos de vitelo eram quase sempre de forma esférica, porém de tamanhos variados e núcleo acidófilo e central.

e) Pós-vitelogênico (fase V): núcleo excêntrico, acidófilo, sem contorno nítido e nucléolos evidentes. Os autores salientaram na espécie a zona radiata espessa e a camada granulosa delgada.

f) Atrésico (fase VI): oócitos sem a forma arredondada típica, com zona radiata fragmentada e grânulos de vitelo desorganizados.

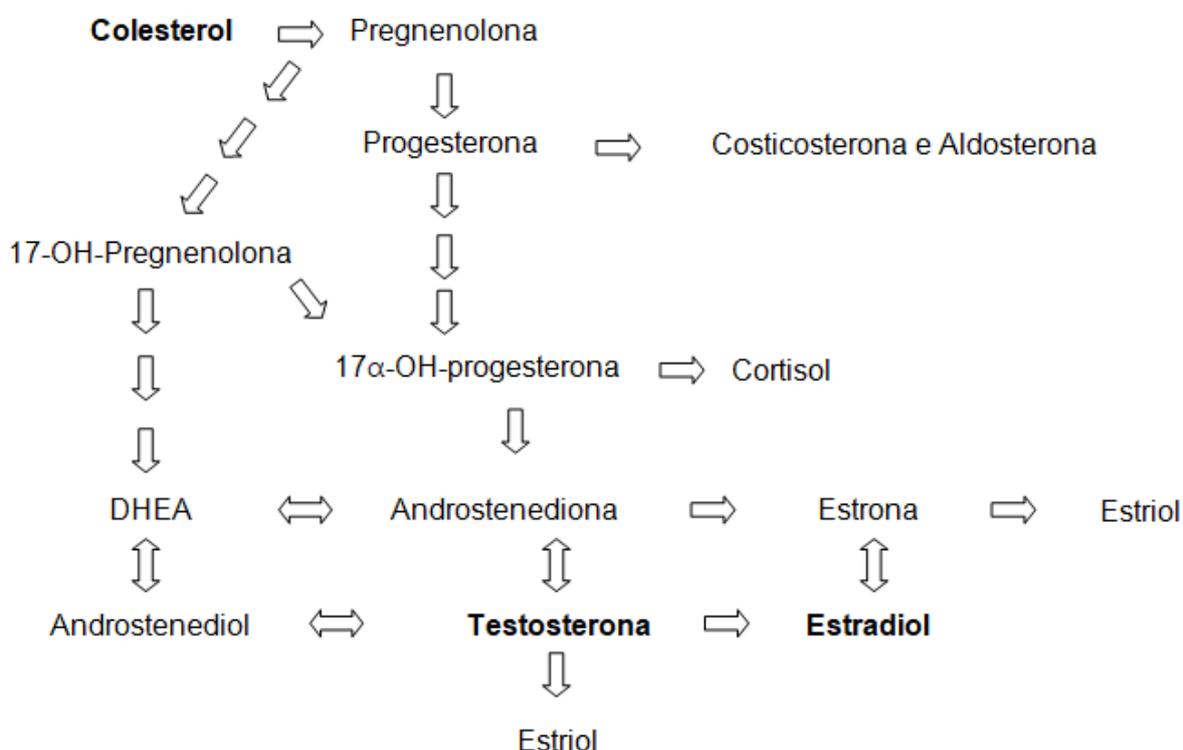
No mesmo estudo de Ganeco et al. (2001), também foi relatado que as mudanças gonadais ocorreram de forma cíclica, em quatro estádios de desenvolvimento: a) *repouso*, quando os ovários apresentavam-se com coloração rósea a alaranjada, pouco desenvolvidos, com pequena vascularização e predomínio de oócitos perinucleolares; b) *maturação inicial*, com ovários maiores que no estágio anterior, com coloração verde-azulada, apresentando uma maior incidência de oócitos vitelogênicos de tamanhos variados, perinucleolares e alvéolo-corticais, além de alguns atrésicos; c) *maturação avançada*, com ovários volumosos, de coloração verde oliva a azul petróleo e grande vascularização, apresentando oócitos grandes em vitelogênese e pós-vitelogênese, com número reduzido de oócitos alvéolo-corticais e cromatina-núcleo; d) *regressão*, quando os ovários apresentaram-se flácidos, com coloração esverdeada e presença de muitos oócitos perinucleolares e alguns oócitos atrésicos.

2.3.3. Hormônios Envolvidos na Maturação

Os hormônios esteróides sexuais têm um papel importante em diversos processos fisiológicos, particularmente na reprodução de vertebrados. Eles são representados principalmente pela progesterona, estradiol e testosterona, e estão intimamente relacionados do ponto de vista bioquímico. Graças ao desenvolvimento dos métodos de estudo da biossíntese hormonal, sabe-se que esses hormônios

representam etapas de uma longa cadeia de transformações estruturais, que se inicia pelo colesterol e termina com o estradiol (Halbe, 1965; Figura 8). Nas gônadas, este processo se inicia nas células da teca dos folículos ovarianos em desenvolvimento e nas células de Leydig, nas fêmeas e nos machos, respectivamente.

Figura 8. Etapas da biossíntese estrogênica no organismo.



DHEA = Dehidroepiandrosterona

Fonte: Adaptado de Halbe (1965).

Independentemente do tipo de diferenciação gonadal, os esteroides sexuais são classicamente considerados os mediadores da diferenciação sexual em vertebrados não mamíferos (Nakamura, 2010), embora não sejam os responsáveis primários pela determinação sexual em si. A ação dos hormônios em tempos precisos e a manutenção de suas atividades biológicas são fundamentais para o perfeito desenvolvimento de ovários e testículos nos peixes. Justamente por isso se torna fácil em peixes direcionar propositalmente a formação do sexo desejado com a simples administração de esteroides na água ou na ração dos animais (Almeida, 2013).

2.3.3.1. Estradiol

Os estrógenos têm sido historicamente associados ao trato reprodutivo feminino. Porém, nas últimas duas décadas, estudos demonstraram que estes hormônios e seus principais receptores também regulam a reprodução masculina (Hess, 2003). Para Cooke (2017), o 17β - Estradiol (E2) é mensurável no sangue do homem e de machos de outras espécies, mas pode alcançar concentrações normalmente encontradas apenas em fêmeas quando determinado nos fluídos provenientes da *rete testis*.

Nas fêmeas, a ação do E2 está bem esclarecida, principalmente no processo de vitelogênese, sendo sintetizado pela da cooperação entre as camadas celulares da teca e da granulosa, que circundam os oócitos. Depois de produzido, o hormônio é liberado na corrente sanguínea, ligando-se aos receptores de estrógenos no fígado e estimulando a síntese da vitelogenina (Vtg) (Arukwe & Goksoyr, 2003). Depois de sintetizada, a Vtg é transportada pelo sangue até o ovário, onde é absorvida pelo oócito por endocitose, até a completa vitelogênese (Grier et al., 2009). Miura et al. (2007) afirmaram que 0,4 ng/mL de E2 foram suficientes para estimular a proliferação mitótica das oogônias em carpa comum (*Cyprinus carpio*), demonstrando que o E2 estimula a progressão das células germinativas ao longo da oogênese. Em *B. orbignyanus*, Rotili (2018) constatou elevadas concentrações plasmáticas de E2 em fêmeas maduras, reforçando a necessidade de um nível hormonal acima da média durante a maturação final e proximidade da desova na espécie.

No sistema reprodutivo masculino, os estrógenos são sintetizados por pelo menos três tipos diferentes de células: Sertoli, Leydig e células germinativas. A concentração destes hormônios no sangue periférico dos machos é tipicamente baixa, porém, pode variar de 2 a 180 pg/mL, dependendo da espécie em estudo (Hess, 2001). A enzima aromatase, que converte os andrógenos (ex.: testosterona) em estrógenos (ex.: estradiol), foi encontrada nos testículos, nas células de Leydig e nas células germinativas imaturas das seguintes espécies de peixes: *Squalus acanthias* (Betka & Callard 1998; Cuevas & Callard, 1997), *Dicentrarchus labrax* (Blázquez et al., 2008; Dalla Valle et al., 2002; González & Piferrer, 2003), *Oncorhynchus mykiss* (Kobayashi

et al., 1998), *Oreochromis niloticus* (Kobayashi et al., 2003) e *Acanthopagrus schlegelii* (Lee et al., 2001).

De acordo com Miura & Miura (2003), o estradiol tem papel principal durante a renovação das células primordiais e proliferação das espermatogônias, mostrando-se essencial na fase inicial da espermatogênese. Porém, uma exposição em longo prazo ao hormônio pode causar efeitos maléficos na qualidade espermática. Segundo Guyón et al. (2012), que utilizaram *Jenynsia multidentata* (barrigudinho) como espécie modelo, a exposição ao estradiol sobre populações selvagens pode causar efeitos na biologia reprodutiva masculina, que podem não ser imediatamente evidentes. Outro fator que deve ser levado em conta são os componentes de contraceptivos orais, como o estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2). Este componente é tipicamente detectado em estações de tratamento de efluentes, e a exposição de peixes a diferentes concentrações de EE2 resulta em diminuição do tamanho da gônada (Tilton et al., 2005), afeta o desempenho espermático e sucesso da fertilização (Schultz et al., 2003; Santos et al., 2007; Coe et al., 2008), além de prejudicar o comportamento parental (Brian et al., 2006).

2.3.3.2. Testosterona

A testosterona é o hormônio chave para o desenvolvimento de características sexuais e dimorfismo no comportamento e morfologia dos machos de vertebrados. Porém, pelo fato de a maioria das fêmeas expressarem níveis detectáveis de testosterona, sugere-se que este hormônio tenha um papel na modulação de traços sexuais secundários no trato sexual de fêmeas (Goymann & Wingfield, 2014).

No ciclo reprodutivo do macho, a testosterona tem efeito em algumas etapas da espermatogênese, como na multiplicação espermatogonial e na formação dos espermátocitos (Billard et al., 1982). Além disso, é precursora da biossíntese do estradiol (Liley, 1986), sendo importante para a ocorrência de todos os processos que envolvem este hormônio no trato reprodutivo do macho.

Os níveis de testosterona são caracteristicamente elevados durante os períodos de espermatogênese e espermiogênese, diminuindo durante o período de repouso

reprodutivo (Fostier, 1983). No estudo de Gazola & Borella (1997), os níveis plasmáticos de testosterona em machos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foram significativamente altos durante a fase de maturação, quando comparado com as outras fases do ciclo testicular. Em pargo australiano (*Pagrus auratus*), os níveis plasmáticos de testosterona aumentaram em peixes que estavam passando pela espermiacção (Carragher & Pankhurst, 1993). No robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), espécie em que os machos liberam seus gametas anualmente, os níveis plasmáticos de testosterona foram maiores durante a espermiacção, desde as fases finais da maturação (Prat et al., 1990). Rotili (2018) investigou o perfil dos hormônios esteróides na piracanjuba e observou que os machos adultos aptos à reprodução apresentaram uma concentração maior de testosterona, caracterizando uma espermatogênese final, espermiacção e regressão.

Em fêmeas, a testosterona foi encontrada no sangue de uma série de peixes teleósteos. O aumento dos níveis deste hormônio durante o desenvolvimento do oócito pode estar relacionado com o seu papel de precursor da produção de 17- β estradiol, estando disponível no ovário para sua posterior aromatização (Rinchard et al., 1993).

Na tilápia azul (*Oreochromis aureus*), o início da desova pelo aumento da temperatura da água foi seguido por um aumento dos níveis da testosterona (Katz & Eckestein, 1974). Da mesma forma, Taghizadeh (2013) avaliou a concentração sazonal dos hormônios esteróides sexuais em *C. carpio*, e observou um maior nível de testosterona no verão, associando este aumento plasmático do hormônio à elevada temperatura da água que ocorre nesta estação. Com isso, sugere-se que a temperatura aparenta ser uma possível causa de pico de testosterona, que chega às gônadas, posteriormente aos seus gametas, levando o animal à maturação gonadal e tornando a fêmea apta a desovar.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipótese:

A razão sexual e o desenvolvimento gonadal de juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) se alteram em função das diferentes temperaturas da água de cultivo.

Objetivo Geral:

Avaliar o efeito de diferentes temperaturas de criação sobre o desenvolvimento gonadal de juvenis de piracanjuba.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar o desenvolvimento gonadal da piracanjuba submetida às temperaturas de 20, 23 e 26°C.
2. Avaliar a razão sexual da piracanjuba submetida às temperaturas de 20, 23 e 26°C.
3. Avaliar a concentração dos hormônios esteróides sexuais testosterona e estradiol nos machos e nas fêmeas de piracanjuba expostos às temperaturas de 20, 23 e 26°C na água de criação.

CAPÍTULO II¹

Desenvolvimento gonadal e razão sexual de piracanjuba *Brycon orbignyana* criadas em diferentes temperaturas

¹Artigo elaborado conforme as normas do periódico *Journal of Fish Biology*.

Gonadal development and sex ratio of piracanjuba *Brycon orbignianus* raised under different temperatures

Helena Robattini Carvalho¹, Diógenes Henrique de Siqueira-Silva², Rômulo Batista Rodrigues¹, Daniel Antonio Rotili¹, Éverton Luís Zardo¹, Andrea Giannotti Galuppo¹, Danilo Pedro Streit Jr.¹

¹Aquam Research Group, Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² UNIFESSPA – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas - IESB, Faculdade de Ciências da Saúde e Biológicas - FACISB, Folha 31, Quadra 07, Lote especial s/n - Nova Marabá - PA, CEP 68507-590, Brazil.

Abstract

The aim of this study was to assess the effect of temperature on gonadal development and sex ratio in the *Brycon orbignyanus*. The animals were kept at three different temperatures (20, 23 and 26°C) since the beginning of exogenous feeding. With 420 days after fertilization, ten individuals were collected per treatment, for histologic and hormonal evaluation of the gonads. The results showed a sexual pattern dependent of temperature. All the animals kept at 20°C were undifferentiated, with only somatic cells in their gonads. In the 23°C, most of the animals were immature males (7/9 – 77,8%). On the other hand, among the animals kept at 26°C, the majority was males in development (6/9 – 66,7%). In this temperature (26°C) males with gonads in regression phase were found too. In the hormonal assay, the only treatment where the animals had detectable estradiol was at 23°C. It was possible to quantify the testosterone in the animals of the three treatments. We can conclude that continuous 23 and 26°C temperatures favor the testicular development in *B. orbignyanus*, as well as the gonadal development is accelerated in fish farming at 26°C, once the males in this treatment had maturity with one year and two months of age.

Keywords: estradiol, migratory fish, sex differentiation, sex ratio, temperature, testosterone.

INTRODUÇÃO

A piracanjuba (*Brycon orbignianus*) é um peixe pertencente à família Bryconidae, ordem Characiformes (Froese & Pauly, 2019), com ampla distribuição geográfica, encontrado principalmente nas bacias dos rios Paraná e Uruguai (Reis et al., 2003), que possuem temperaturas mínimas de 18,43° e 12,9°C, e máximas de 25,57° e 25,42°C, respectivamente (ANA, 2020). É uma espécie comumente utilizada na pesca esportiva (Zaniboni-Filho et al., 2006), além de possuir um elevado potencial produtivo, devido à boa conversão alimentar e aceitação de dieta artificial (Borba et al., 2006; Ninhaus-Silveira et al., 2006). No entanto, a espécie encontra-se em perigo de extinção (ICMBio, 2018), e, segundo Lopera-Barrero (2009), este fato se deve a diversos fatores ecológicos e climáticos, especialmente aqueles relacionados com ações humanas, como pesca predatória, construção de barragens hidrelétricas e redução da fonte de alimento natural pelo desmatamento.

A redução da população da piracanjuba estabelece a necessidade de atividades voltadas à sua reinserção na natureza. Alguns critérios merecem atenção nos programas de reintrodução de espécies a partir do repovoamento e, segundo Piferrer (2009), a razão sexual entre machos e fêmeas de uma população a ser reintroduzida é um dos mais importantes, por ser um parâmetro ecológico basal que tem influência direta na estrutura populacional, no potencial reprodutivo e, conseqüentemente, na sobrevivência e propagação da espécie. Embora a razão sexual dos peixes neotropicais geralmente seja 1:1 (Lowe-McConnell, 1987), Vazzoler (1996) afirma que, em análises mais detalhadas, podem ser constatadas alterações na razão sexual. Em cativeiro, tem se observado, de forma empírica, uma desproporção entre machos e fêmeas de piracanjuba, o que pode ser tornar um problema, especialmente pelo fato de que esta espécie é extensamente utilizada em programas de repovoamento.

Peixes que apresentam determinação sexual ambiental têm a temperatura como principal fator de influência do meio em que estão (Baroiller & Cotta, 2001). Por exemplo, temperaturas abaixo ou acima do normal durante o desenvolvimento larval podem levar a razões sexuais tendenciosas em diversas espécies (Wallace et al., 1999; Devlin & Nagahama, 2002). Na maioria dos indivíduos termosensíveis, a razão

entre machos e fêmeas aumenta com a temperatura (Baroiller & Cotta, 2001), pelo fato da diferenciação ovariana ser inibida por temperaturas altas (Almeida, 2013).

Este fato se torna importante, dado que as mudanças climáticas, principalmente em decorrência das ações do homem, têm sido causas de impactos ambientais a nível regional e global. Tais efeitos induzem ao aumento da temperatura, que é um fator de extrema importância para os processos biológicos e ecológicos nos peixes, tais como crescimento, reprodução, desenvolvimento e migração (Amaral & Vale, 2010). Portanto, a exposição a mudanças no ambiente (antropogênicas ou não) pode levar a alterações na proporção do sexo de uma população (Cotton & Wedekind, 2009).

Do ponto de vista produtivo, é conveniente a manipulação da determinação sexual do lote a ser produzido. Segundo Reis et al. (2016), pode haver uma agregação de valor ao produto se forem produzidos somente indivíduos do sexo com superioridade zootécnica. Na maioria dos peixes, as fêmeas representam o gênero mais rentável (Beardmore et al., 2001), geralmente por apresentarem puberdade mais tardia que os machos. Já a criação de lotes masculinos é praticada com várias espécies, como por exemplo, na tilapicultura. Gêneros que são altamente prolíferos nos tanques de piscicultura geram lotes desuniformes. Como os machos apresentam crescimento mais rápido que as fêmeas, os lotes exclusivos de machos não só evitam a reprodução indesejada, como aumentam a produção (Bombardelli et al., 2007; Zanoni et al., 2013).

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes temperaturas de criação sobre o desenvolvimento gonadal e a razão sexual de juvenis de piracanjuba.

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo grupo de pesquisa AQUAM, e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS, sob o número 35755.

MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

As larvas foram adquiridas na Piscicultura Panamá Ltda, da cidade de Paulo Lopes/SC, e transportados até o laboratório seguindo as recomendações de Kubitza (2009), alojadas em sacos plásticos contendo 200g de peixe por litro, contendo água salinizada com doses de 7g de sal por litro, com a água ocupando um terço do saco e o restante preenchido de oxigênio.

Os animais foram dispostos em caixas d'água de 500L, onde o controle das temperaturas dos tratamentos foi feito com o auxílio de *chillers* industriais de controle térmico e refrigeração. Durante os primeiros 30 dias de funcionamento do sistema, as caixas foram mantidas sem animais, a fim de estabelecer os parâmetros físico-químicos da água. O pH e as concentrações de amônia, nitrito (medidos semanalmente) e oxigênio dissolvido (medido diariamente) foram, respectivamente, $5,7 \pm 1,2$, $2,0 \pm 1,6$ mg/L, $0,280 \pm 0,150$ mg/L e $7,3 \pm 2,3$ mg/L.

Para garantir o controle da qualidade da água, mídias biológicas de plástico foram misturadas ao efluente das caixas d'água. Como filtro mecânico, foi utilizado o *Bead Filters Altamar - A14*, projetado especificamente para realizar filtração mecânica em sistemas com organismos aquáticos.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, recebendo ração de granulometria de acordo com o tamanho da boca dos peixes. As caixas d'água eram sifonadas três vezes na semana para remoção dos excrementos acumulados em seu assoalho.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, testando três temperaturas (20, 23 e 26°C). No início da alimentação exógena, 28 h após a eclosão, (Maciel et al., 2010), 300 larvas de *B. orbignyana* foram distribuídas aleatoriamente em três sistemas de aquecimento de água, ao longo de 420 dias, totalizando em 100 larvas por tratamento.

COLETA E ARMAZENAMENTO DAS GÔNADAS

Ao completarem 420 dias após a fecundação, foram coletados aleatoriamente dez indivíduos de cada tratamento. Para a coleta das gônadas e das características zootécnicas, os animais foram eutanasiados a partir da utilização de uma solução de 10 mL (10.000 mg) de eugenol diluídos em 90 mL de álcool etílico PA (99,5%), correspondendo a uma concentração de 100 mg/mL. Foram adicionados 30 mL desta solução em 970 mL de água, equivalendo a uma concentração de 3.000 mg/L (Vidal, 2008) e, em seguida, os animais foram imersos nesta mistura.

Para as medidas dos indivíduos, utilizou-se um paquímetro universal com faces de medição em metal duro (Capacidade 300mm/12" Resolução de 0,08mm) para a obtenção dos comprimentos total e padrão dos animais e, para verificação do peso, utilizou-se uma balança semi-analítica com capacidade de 3200g e precisão de 0,01g. Posteriormente, as gônadas foram retiradas, pesadas e divididas em duas partes: a primeira foi mergulhada em solução de glutaraldeído a 2,5%, com um volume 20 vezes maior que o tamanho do fragmento, a fim de obter uma correta fixação para posterior análise histológica; a segunda foi imersa em água destilada, para posterior processamento e análise hormonal, sendo mantida resfriada entre 2 e 8°C.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA HISTOLOGIA

Já fixadas, as gônadas foram desidratadas em soluções graduais de etanol (70, 80, 95% e absoluto), diafanizadas em xilol e inclusas em parafina Paraplast® SIGMA-ALDRICH. Logo após este processo, o material foi cortado a 5 µm em micrótomo manual rotativo de parafina Lupetec modelo MRP 2015 equipado com navalha de aço. As lâminas obtidas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (Carson & Hadlik, 2009) e, em seguida, analisadas em microscópio óptico (Physis). A fotodocumentação foi realizada com a utilização de câmera (Even 10,5 MP) e auxílio do programa Future WinJoe™. O procedimento foi realizado no grupo GERPA da Faculdade de Ciências da Saúde e Biológicas da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HORMONAL

As porções das gônadas mantidas resfriadas (2 – 8°C) em água destilada foram usadas para análise hormonal, passando obrigatoriamente por um processo de

maceração em dispersor ULTRA TURRAX IKA T25 Digital, uma vez que o analisador hormonal *cobas e 411* aceita apenas amostras liquefeitas. Após a preparação, o material foi levado resfriado ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para análise da testosterona e do estradiol.

Princípio da determinação de testosterona e estradiol

Os testes utilizados foram *Elecsys Testosterone II* e *Elecsys Estradiol III*, da empresa Cobas®, compatíveis com o analisador *cobas e 411*, que têm por finalidade o imunoensaio para a determinação quantitativa *in vitro* da testosterona e estradiol em soro e plasma humanos. Os testes possuem princípio de competição, com duração total do ensaio de 18min (Roche, 2010a; Roche, 2010b).

ESTATÍSTICA

A proporção de machos e fêmeas, definida com base na avaliação histológica, foi comparada pelo teste *chi-square goodness-of-fit*, ao nível de 5% de significância, com a distribuição esperada de 50% de machos e 50% de fêmeas. Os dados quantitativos, como índices zootécnicos e concentrações hormonais, foram analisados com o auxílio do software Statistical Analysis System (SAS) e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Levene. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, juntamente com o teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância.

RESULTADOS

ÍNDICES ZOOTÉCNICOS

A partir dos dados coletados, foi possível analisar as médias e os desvios padrões de peso, comprimento padrão e índice gonadossomático (IGS = [(peso da gônada/peso corporal) × 100] (adaptado de Vazzoler, 1996) de *B. orbignyana* mantidos nas diferentes temperaturas (Tabela 1). Em relação às médias do peso e do comprimento padrão, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os animais submetidos às temperaturas de 23 e 26°C, enquanto no tratamento de 20°C as médias foram menores

($P < 0,05$) em comparação aos demais. Por outro lado, o IGS médio dos animais submetidos às temperaturas de 20 e 26°C diferiram ($P < 0,05$) entre si, com o IGS médio dos animais mantidos em 23°C não diferindo ($P > 0,05$) dos demais grupos.

Tabela 1. Índices zootécnicos de *B. orbignyana* criados em diferentes temperaturas.

Tratamentos (°C)	Nº de animais	Peso (g)	Comprimento padrão (cm)	IGS (%)
20	10	34,8±12,0 ^b	12,1±1,5 ^b	0,04±0,01 ^b
23	10	95,4±35,1 ^a	16,6±2,0 ^a	0,06±0,02 ^{ab}
26	10	112,2±35,8 ^a	17,2±1,6 ^a	0,09±0,03 ^a

Médias aritméticas simples ± desvio padrão, seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Por meio das análises histológicas das gônadas, foi possível a identificação de uma distribuição anormal de machos e fêmeas (Tabela 2) nos tratamentos de 23 e 26°C, uma vez que os valores de X^2 para cada tratamento foram superiores ao X^2 tabelado, rejeitando-se a hipótese de uma distribuição normal de machos e fêmeas nas populações destes tratamentos. Os animais indiferenciados foram desconsiderados nesta análise estatística.

Tabela 2. Análise da distribuição de machos e fêmeas de piracanjubas mantidas nos tratamentos de 23 e 26°C.

Tratamentos (°C)	Machos		Fêmeas		X^2
	Esperado	Observado	Esperado	Observado	
	N (%)				
23	4 (50)	7 (87,5)	4 (50)	1 (12,5)	4,5
26	4 (50)	8 (100)	4 (50)	0 (0)	8,0

X^2 tabelado a 5% de significância = 3,84

Como observado na Figura 1, todos os animais mantidos a 20°C ainda estavam indiferenciados, tendo em suas gônadas somente células somáticas (Fig. 2a). A maioria dos animais mantidos a 23°C eram machos (77,8%) e estavam imaturos, com testículos apresentando espermatogônias em proliferação (Fig. 2b). Uma fêmea imatura também foi identificada, com ovários que continham somente oócitos em crescimento primário, com citoplasma basofílico (Fig. 3). Em contrapartida, dos animais mantidos na temperatura mais alta (26°C), a maioria (66,7%) estava em desenvolvimento, apresentando cistos espermatogênicos com células germinativas em todas as fases de desenvolvimento, além de espermatozoides no lúmen tubular (Fig. 2c-d). Os animais cultivados a 26°C também apresentaram testículos em fase de regressão, como pode ser observado na Figura 2e, pela presença de espermatozoides residuais e na Figura 2f, pela morte celular e desorganização tecidual.

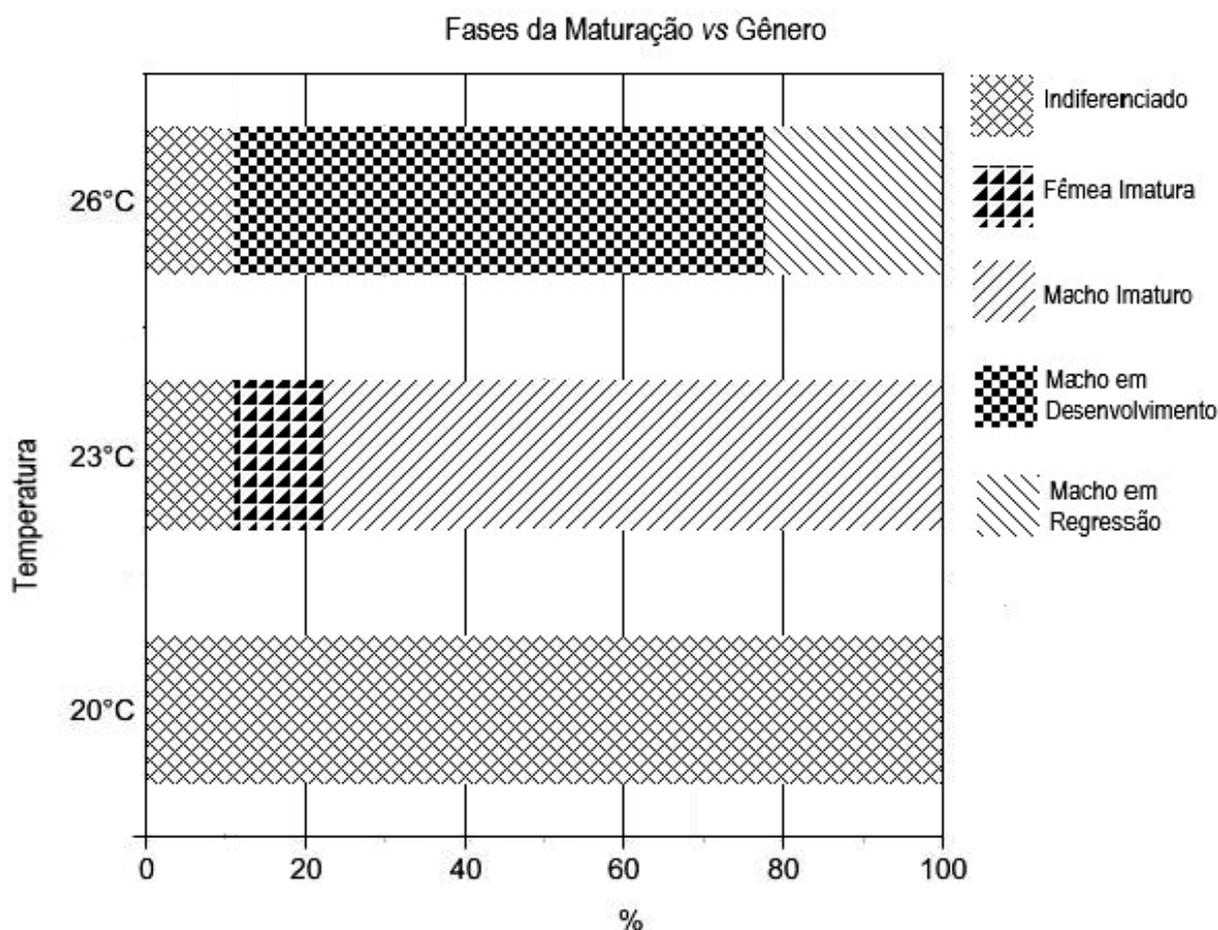


Figura 1. Fases de maturação dos *B. orbignyana* incubados nas três temperaturas experimentais, 20, 23 e 26°.

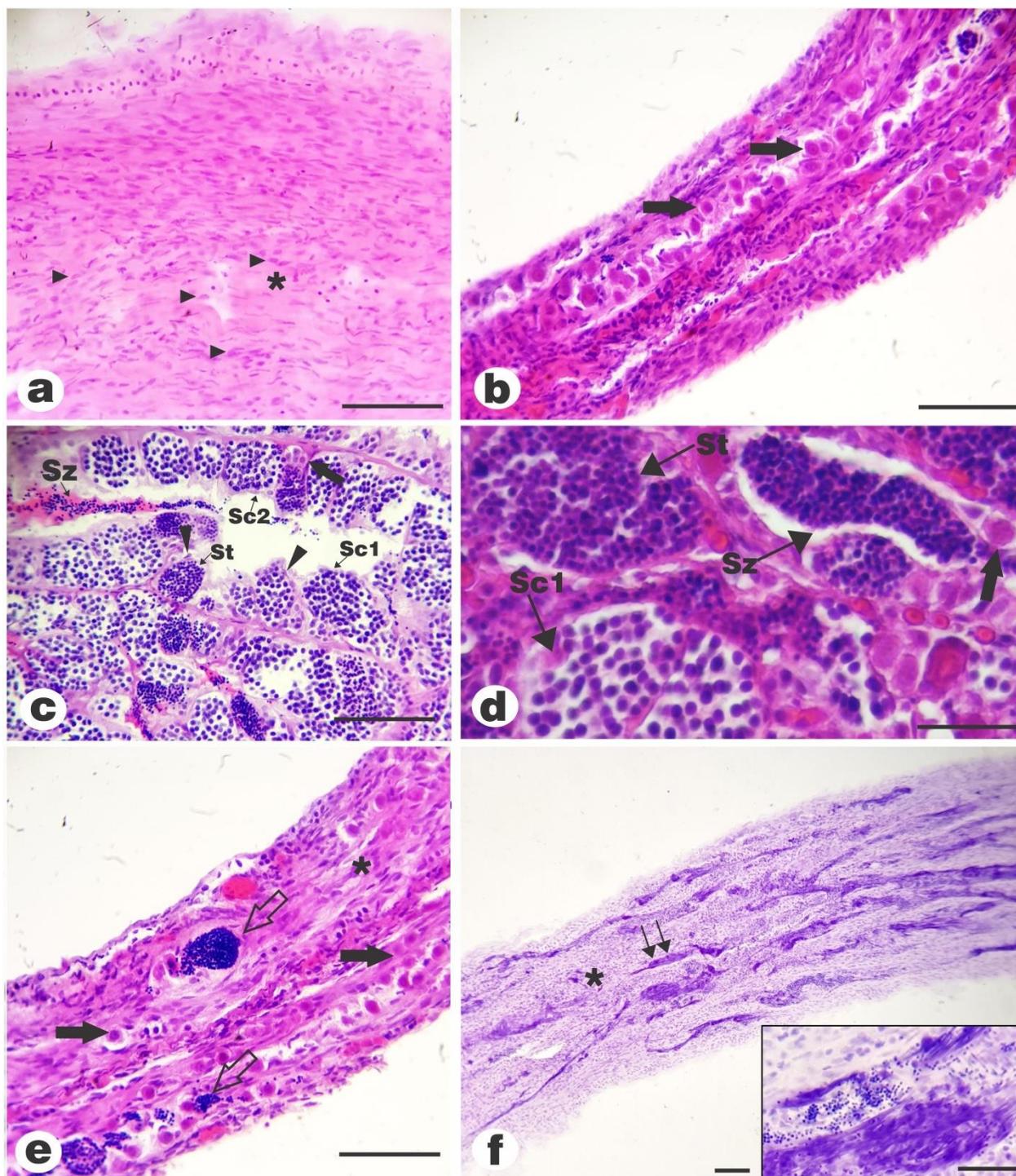


Figura 2. Características histológicas testicular de *B. orbignyana*. (a) Animal indiferenciado apresentando somente células somáticas (cabeça de seta). (b) Macho imaturo, com a presença de espermatogônias indiferenciadas isoladas (seta). (c-d) Testículos de animais em desenvolvimento, destacando a presença de cistos de células germinativas (Sc: espermatócitos; St: espermatídes; Sz: espermatozoide). (e-f) Testículos em regressão. Com espermatozoides residuais (seta vazada), morte celular e desorganização tecidual (setas duplas). Asterisco representa o interstício que toma grande parte da gônada. Barras de escala: a-d, f = 50µm. e = 100µm. Inset = 10 µm. Coloração H.E.

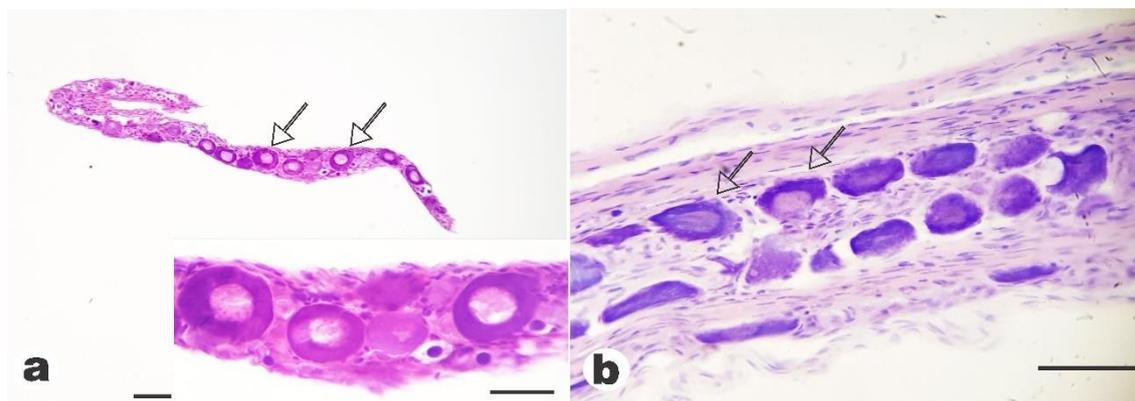


Figura 3. Características histológicas ovarianas de *B. orbignyana*. (a) Visão geral de um ovário de fêmea imatura encontrada na temperatura de 23°C, com poucos oócitos em crescimento primário (seta) Inset: Aumento da Imagem a, evidenciando os oócitos. (b) Ovário com oócitos em crescimento primário. Barras de escala: 10µm. Coloração H.E.

ANÁLISE HORMONAL

Em relação ao estradiol, os únicos animais que apresentaram valores superiores ao limite de detecção do teste (5,00 pg/ml) utilizado foram os animais expostos à temperatura de 23°C. Por outro lado, nos indivíduos dos outros tratamentos, 20 e 26°C, as amostras analisadas não atingiram a concentração mínima de estradiol que pode ser verdadeiramente distinguida de zero pela metodologia utilizada no estudo.

Em todos os tratamentos a concentração de testosterona foi superior a 0.025 ng/ml, (limite mínimo de detecção do teste utilizado), mas não apresentaram diferença estatística entre si ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

Em peixes, na maioria das espécies termossensíveis, o número de machos aumenta sobre o número de fêmeas com a elevação da temperatura (Baroiller & Cotta, 2001). Este fato pode ser explicado pelos animais estarem em temperaturas elevadas, e com isso existir um aumento dos níveis plasmáticos de cortisol, glucocorticóide responsável pela supressão da expressão do gene *Cyp19a*, inibindo a síntese da aromatase e, portanto, a síntese de estradiol e consequente desenvolvimento ovariano (Almeida, 2013). No presente estudo, os resultados histológicos sugerem uma distribuição anormal de machos e fêmeas para *B. orbignyana* em temperaturas de 23

e 26°C, pois os grupos mantidos nestes tratamentos resultaram em 77,7 e 88,8% de machos, respectivamente. Resultados similares foram encontrados por Corona-Herrera et al. (2016), também utilizando uma espécie de águas neotropicais como modelo. No caso, a exposição de *Chirostoma estor* a altas temperaturas (32-34°C) levou a uma razão sexual com tendência para o sexo masculino. Assim como a espécie medaka *Oryzias latipes*, em que temperaturas altas (32-34°C) deram início à masculinização da espécie (Forconi et al., 2013). Apesar de possuir um suposto sistema genético de determinação sexual (Viveiros et al., 2001), o bagre-africano *Clarias gariepinus* apresentou uma população com 78-100% de machos quando exposta à temperatura de 36,5°C (Santi et al., 2017). Vale salientar que não sabemos a distribuição de machos e fêmeas da população exposta ao tratamento de 20°C, existindo a chance de esses animais apresentarem a razão esperada de 1:1 após a ocorrência do desenvolvimento gonadal.

Por outro lado, a temperatura também foi determinante quanto à maturidade sexual dos animais mantidos a 26°C, uma vez que os indivíduos deste tratamento apresentaram cistos de espermatozoides, assim como testículos em regressão com espermatozoides residuais. Estes exemplares tinham idade e comprimento padrão de 420 dias e 17,8±1,6 cm, respectivamente, inferior à informação citada por Ceccarelli et al. (2005). Neste caso, os autores relataram que, no meio ambiente, os machos de *B. orbignyana* estão maduros a partir de dois anos de idade (730 dias), com média de 50 cm de comprimento, enquanto a fêmea está apta a reprodução a partir do terceiro ano de idade, com média de 62 cm. Portanto, podemos aceitar a hipótese de que o desenvolvimento gonadal de juvenis de piracanjuba (*B. orbignyana*) se altera em função das diferentes temperaturas da água de cultivo.

Por expressar a porcentagem que as gônadas representam do peso total dos indivíduos, o IGS foi mensurado em nosso estudo, sendo definido por Vazzoler (1996) como um indicador eficiente do estado funcional dos órgãos reprodutivos. Mesmo apresentando as médias de IGS sem diferir dos tratamentos de 20 e 26°C, o que nos levaria a concluir que os animais poderiam estar no mesmo estágio reprodutivo, níveis de estradiol elevados foram encontrados apenas nos animais mantidos a 23°C. Este fato reforça o papel deste hormônio durante a renovação das células primordiais e

proliferação das espermatogônias (Miura & Miura, 2003), uma vez que todos os machos deste tratamento (7/9) foram identificados histologicamente como imaturos, apresentando proliferação espermatogonial como única atividade da espermatogênese em andamento. Em relação aos machos do tratamento de 26°C, a ausência de estradiol pode ser explicada pelo fato destes animais estarem nas últimas fases da espermatogênese (presença de espermatócitos e espermatozoides) e, segundo Lahnsteiner et al. (2006), grandes concentrações deste hormônio nesta etapa final de amadurecimento testicular podem promover uma redução no líquido seminal, podendo levar à redução da fertilidade. Quanto à ausência do estradiol nos indivíduos do tratamento de 20°C pode estar relacionada ao fato de que este hormônio é resultado da aromatização da testosterona, que perde um carbono para que o estradiol seja formado (Halbe, 1965). Portanto, podemos inferir que nos animais indiferenciados expostos à temperatura de 20°C (8/8) a esteroidogênese ainda não teve seu início. Por estar quiescente, as transformações estruturais consequentes a este processo ainda não resultaram na formação do estradiol.

Os valores encontrados para testosterona não diferiram entre si nas três temperaturas, mesmo com animais em diferentes fases de desenvolvimento gonadal. Este resultado pode ser explicado a partir do ciclo reprodutivo do macho, em que a testosterona tem efeito em algumas etapas da espermatogênese, como na multiplicação espermatogonial e na formação dos espermatócitos (Billard et al., 1982), sendo importante em todas as fases da espermatogênese e período de espermiogênese (Fostier, 1983). Já nas fêmeas, a presença da testosterona durante o desenvolvimento do oócito pode estar relacionada com o seu papel de precursor da produção de estradiol, estando disponível no ovário para sua posterior aromatização (Rinchard et al., 1993). Portanto, os indivíduos identificados histologicamente como indiferenciados não podem ser classificados como machos ou fêmeas a partir da análise hormonal, uma vez que os hormônios esteróides sexuais analisados são importantes em ambos os tratamentos reprodutivos, e apresentaram valores semelhantes entre os animais.

Outro detalhe que deve ser considerado é a mudança climática a partir do aquecimento global, pois tais efeitos induzem ao aumento da temperatura, que é um

fator de extrema importância para os processos biológicos e ecológicos nos peixes, tais como crescimento, reprodução, desenvolvimento e migração (Amaral & Vale, 2011). Segundo Honeycutt et al. (2019), as populações silvestres de linguado do sul *Paralichthys lethostigma* correm o risco de masculinização pelo aumento da temperatura da água, uma vez que acima de 27°C a porcentagem de machos chega a 94%, e esta temperatura faz parte do aumento previsto nas águas em que este animal é nativo. Um aumento na temperatura média das bacias dos rios Paraná e Uruguai é um motivo severo de preocupação, uma vez que os resultados obtidos neste estudo provaram que em 23°C a razão sexual da espécie já entra em desequilíbrio, tornando-se um problema para a manutenção das populações silvestres.

Do ponto de vista produtivo, é conveniente a manipulação da determinação sexual do lote a ser produzido. A criação de lotes masculinos é praticada em várias espécies, como por exemplo, na tilapicultura. Gêneros que são altamente prolíferos nos tanques de piscicultura geram lotes desuniformes. Os lotes exclusivos de machos não só evitam a reprodução indesejada, como podem aumentar a produção (Bombardelli et al., 2007; Zanoni et al., 2013).

Portanto, é interessante conhecer a influência da temperatura sobre a fisiologia de *B. orbignyanus*, pois este manejo pode auxiliar na criação da espécie para fins conservacionistas ou comerciais. A partir deste estudo, podemos afirmar que a exposição contínua a temperaturas acima de 23°C após o início da alimentação exógena pode gerar populações com uma maior distribuição de machos.

CONCLUSÃO

Temperaturas contínuas de 23 e 26°C em cativeiro produzem uma razão sexual desequilibrada em *Brycon orbignyanus* em favor do sexo masculino, assim como há um desenvolvimento gonadal acelerado na temperatura de 26°C, uma vez que os machos deste tratamento estavam maduros com um ano e dois meses de idade.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES), e às companhias do setor elétrico BAESA e Enercan pelos recursos e incentivo à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Águas – ANA. Séries Históricas de Estações. Disponível em: <http://www.snirh.gov.br/hidroweb/serieshistoricas> . Acesso em: 18 abr de 2020.
- Almeida, F. L. (2013) Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, **37**, 174 – 180.
- Amaral, M. T. & Vale, R. C. S. (2010) Biodiversidade e mudanças climáticas: um olhar sobre a Amazônia. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer **6**, 1 - 14.
- Baroiller, J. F. & Cotta, H. D. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **130**, 399 – 409.
- Baroiller, J. F., Chourrout, D., Fostier, A., Jalabert, B. (1995). Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding Cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology*, **273**, 216–223.
- Beardmore, J. A.; Mair, G. C.; Lewis, R. I. (2001). Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, **197**, 283-301.
- Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton, B. (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **39**, 65-79.
- Bombardelli, R. A.; Sanches, E. A.; Pinto, D. F. H.; Marcos, R. M.; Barbero, L. (2007) Idade de maior sensibilidade de tilápia-do-nilo aos tratamentos de masculinização por banhos de imersão. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **36**, 1-6.
- Borba, M. R., Fracalossi, D.M., Pezzato, L.E. (2006). Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. *Aquaculture Nutrition*, **12**, 183-191.
- Carson, F. L. & Hadlik, C. (2009). *Histotechnology: Self-Instructional Text*. 3 ed. Chicago, EUA: ASCP Press.
- Castagnolli, N. (1992). *Criação de peixes de água doce*. Jaboticabal: FUNEP
- Ceccarelli, P. S., Senhorini, J. A., Rego, R. F. (2005). Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) In: Baldisserotto B. & Gomes L.C. (Ed). *Espécies nativas*

para piscicultura no Brasil. (pp 121 -147). Santa Maria, RS: Editora da Universidade Federal de Santa Maria.

- Corona-Herrera, G. A., Tello-Ballinas, J. A., Hattori, R. S., Martínez-Palacios, C. A., Strüssmann, C. A., Cárdenas-Reygadas, R. R., Martínez-Chávez, C. C. (2016). Gonadal differentiation and temperature effects on sex determination in the freshwater pike silverside *Chirostoma estor* Jordan 1880. *Environmental Biology of Fishes*, **99**, 463–471.
- Cotton, S. & Wedekind, C. (2009). Population consequences of environmental sex reversal. *Conservation Biology*, **23**, 196-206.
- 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.
- Forconi, M., Canapa, A. Barucca, M., Biscotti, M. A., Capriglione, T., Buonocore, F. Fausto, A. M., Makapedua, D. M., Pallavicini, A., Gerdol, M., De Moro, G., Scapigliati, G., Olmo, E., Scharl, M. (2013). Characterization of sex determination and sex differentiation genes in latimeria. PLoS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056006>
- Fostier, A. The gonadal steroids. (1983) In: Hoar, W.S., Randall, D. J. & Donaldson, E. M. (Eds.), *Fish Physiology* (pp. 277-346). New York, NY: Academic Press.
- Froese, R. & Pauly, D. (2019). Editors. FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <https://www.fishbase.de/summary/Brycon-orbignyianus.html>.
- Halbe, W. H. (1965). Biossíntese dos estrogênios. *Revista De Medicina*, **49**, 226-234.
- Honeycutt, J. L., Deck, C. A., Miller, S. C., Severance, M. E., Atkins, E. B., Luckenbach, J. A. (2019). Warmer waters masculinize wild populations of a fish with temperature-dependent sex determination. *Scientific Reports*. **9**, 6527. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42944-x> ICMBio. (2018). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*: Volume I. p. 492. Brasília – DF.
- Kubitza, F. (2009) Manejo na Produção de Peixes. Parte 07 – Boas práticas no transporte de peixes vivos. *Panorama da Aquicultura*. **19**, 114, 14 - 23.
- Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Kletzl, M.; Weismann, T. (2006). Effect of 17 β -estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, **79**, 124–131.
- Lopera-Barrero, N. M. (2009). Conservation of Brycon orbignyianus natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model

- for species threatened with extinction. *Ciência e Investigação Agrária*, **36**, 191-208.
- Lowe-McConnell, R. H. (1987) *Ecological Studies in Tropical Fish Communities* (Cambridge Tropical Biology Series). Cambridge: *Cambridge University Press*. doi:10.1017/CBO9780511721892
- Maciel, C. M. R. R.; Lanna, E. A. T., Junior, A. M., Donzele, J. L., Neves, C. A.; Menin, E. (2010) Morphological and behavioral development of the Piracanjuba larvae. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **39**, 961 – 970.
- Miura, T. & Miura, C. I. (2003). Molecular control of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*, **28**, 181- 86.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Veríssimo-Silveira, R., Senhorini, J. A. (2006) Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **49**, 651 – 659.
- Piferrer, F.(2009) 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* (pp 247-336). Madrid, ES: Publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación observatorio Español de Acuicultura.
- Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J. Jr.(org.) (2003) Check list of freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, 742p.
- Reis, V. R.; Almeida, F. L.; Piferrer, F. (2016). Produção de populações monossexo em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **40**, 22 – 28.
- Rinchard, J., Kestemont, P., Kuhn, E. R., Fostier, A. (1993). Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the gudgeon *Gobio gobio* L; (Teleostei, Cyprinidae). *General and Comparative Endocrinology*, **92**, 168–178.
- Roche (2010a) *Folha de métodos do Elecsys Testosterone II Cobas®*. Referência 05200067190 - cobas e 411. Disponível em: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/br/pt/Documents/GetDocument?documentId=b49049cc-6c10-e911-4ba7-00215a9b3428
- Roche (2010b) *Folha de métodos do Elecsys Estradiol III Cobas®*. Referência 06656021190 cobas e 411. Disponível em: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/br/pt/Documents/GetDocument?documentId=e4ca786d-9495-e811-828e-00215a9b3428
- Santi S., Rougeot, C., Toguyeni, A., Gennotte, V., Kebe, I., Melard, C. (2017). Temperature Preference and Sex Differentiation in African catfish, *Clarias gariepinus*. *Journal of Experimental Zoology*, **317A**, 28 – 37.

- Vazzoler, A. E. A. M. (1996) *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá, PR: EDUEM.
- Vidal, L. V. O., Albinati, R. C. B., Albinati, A. C. L., de Lira, A. D., Almeida, T. R., Santos, G. B. (2008) Eugenol como anestésico para a tilápia do Nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **43**, 1069-1074.
- Viveiros, A. T. M., Eding, E. H., Komen, J. (2001). Effect of 17α - methyltestosterone on seminal vesicle development and semen release response in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Reproduction*, **122**, 817–827.
- Wallace, H.; Badawy, G. M. I.; Wallace, B. M. N. (1999). Amphibian sex determination and sex reversal. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**, 901–909.
- 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.
- Zanoni, M. A.; Leal, T. V.; Caetano, M. F.; de Oliveira, C. A. L.; Ribeiro, R. P. (2013) Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes temperaturas durante fase de diferenciação sexual. *Semina: Ciências Agrárias*, **34**, 455 – 466.

CAPÍTULO III

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos através deste estudo, podemos dizer que a produção de juvenis de piracanjuba para fins conservacionistas pode ser prejudicada em temperatura igual ou superior a 23°C, uma vez que os animais mantidos nestas condições de cultivo apresentaram uma desproporcionalidade na razão sexual, circunstância esta considerada um problema nas populações utilizadas para o repovoamento ambiental.

Porém, os resultados apresentados podem auxiliar na produção comercial da espécie, uma vez que lotes masculinos podem ser benéficos economicamente. Mais estudos são recomendados para avaliar os parâmetros zootécnicos que podem ser explorados nos machos.

A observação da ação de diferentes temperaturas em indivíduos *Brycon orbignyanus* mantidos desde a fase embrionária nos diferentes tratamentos também é interessante, uma vez que neste estudo os animais já tinham 28h de vida ao serem distribuídos nos tratamentos. Uma temperatura que proporcione uma razão sexual de 1:1 pode ser encontrada com o manejo da água de criação onde se encontram os reprodutores e os embriões.

REFERÊNCIAS

- AGAHAMA, Y.N.; YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, Growth and Differentiation**, Tokyo, v. 50, p. 195–219, 2008. Supl. 1.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA. **Séries Históricas de Estações**. Brasília, DF, [2020]. Disponível em: <http://www.snirh.gov.br/hidroweb/serieshistoricas> . Acesso em: 18 abr. 2020.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology**, Malden, v. 19, n. 3, p.646-652, 2005.
- AGOSTINHO, A. A., et al. 2003. Migratory fish from the upper Paraná river basin, Brazil. *In*: CAROLSFELD, J. *et al.* (ed.). **Migratory fishes of the South America: biology, social importance and conservation status**. Ottawa: World Fisheries Trust, 2003. p. 19 - 99.
- ALMEIDA, F. L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n.2, p. 174 – 180, 2013.
- AMARAL, M. T. & VALE, R. C. S. Biodiversidade e mudanças climáticas: um olhar sobre a Amazônia. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 6, n. 11, p. 1-14. 2010.
- ARUKWE, A.; GOKSOYR, A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. **Comparative Hepatology**, London, v. 2, n. 1, p. 4, 2003.
- BAROILLER, J. F.; COTTA, H. D. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, New York, v. 130, n. 4, p. 399–409, 2001.
- BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 2014. 336p.
- BEARDMORE, J. A., MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, v.197, p.283-301, 2001.
- BETKA, M.; CALLARD, G.V. Negative feedback control of the spermatogenic progression by testicular oestrogen synthesis: insights from the shark testis model. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 106, n. 1, p. 252– 257, 1998.
- BILLARD, R. *et al.* Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 39, n. 1, p. 65-79, 1982.

BLÁZQUEZ, M. *et al.* Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 158, n. 1, p. 95–101, 2008.

BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Idade de maior sensibilidade de tilápia-do-nylo aos tratamentos de masculinização por banhos de imersão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.1-6, 2007.

BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 183-191, 2006.

BRIAN, J. V.; AUGLEY, J. J.; BRAITHWAITE, V. A. Endocrine disrupting effects on the nesting behaviour of male three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. **Journal of Fish Biology**, v. 68, n. 6, p. 1883 – 1890, 2006.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP. 1992.

CASTRO, P. L. **Contribuição genética e reprodutiva de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e extrusão**. 42 f. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

CASTRO, P. L. *et al.* Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 12, p. 6. 2017.

CASTRO, P. L. *et al.* Variabilidade genética de larvas e alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 71, n. 2, p. 696–702, 2019.

CARRAGHER, J.F.; PANKHURST, N.W. Plasma levels of sex steroids during sexual maturation of snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae), caught from the wild. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 109, n. 3/4, p. 375-388, 1993.

CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; REGO, R. F. Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). *In*: BALDISSEROTTO, B.; GOMES L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 121–147.

CHEN, J.; HU, W.; ZHU, Z.Y. Progress in studies of fish reproductive development regulation. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v.58, p.7-16, 2013.

COE, T. S. *et al.* An environmental estrogen alters reproductive hierarchies, disrupting sexual selection in group-spawning fish. **Environmental Science & Technology**, v. 42 (13), p. 5020 – 5025, 2008.

COTTON, S.; WEDEKIND, C. Population consequences of environmental sex reversal. **Conservation Biology**, Malden, v. 23, n. 1, p. 196-206, 2009.

COSTA, R. B. *et al.* Sexual definition: is there a pattern in the sexuality of fish? A Revision. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 7, n. 2, p. 390-415, jul./dez.2013.

CUEVAS, M.E.; CALLARD, G. In vitro steroid secretion by staged spermatocysts (Sertoli/ germ cell units) of dogfish (*Squalusacanthias*) testis. **General and Comparative Endocrinology**, New York,v. 88, n. 1, p. 151–165,1992.

DALLA VALLE, L. *et al.* European sea bass (*Dicentrarchuslabrax L.*) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, New York,v. 80, n. 1, p. 25–34, 2002.

DEVINCENZI, G. J. & TEAGUE, G. W. Ictiofauna del Rio Uruguay medio. **Anales del Museo de Historia Natural de Montevideo**. Série 2 (5) 4:101. 1942.

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

DI CHIACCHIO, I. M., *et al.* Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. **Thetiogenology**, New York, v. 90, p. 284 – 288. 2017.

FORCONI, M. *et al.* Characterization of sex determination and sex differentiation genes in latimeria. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, [art.] e56006, 2013.

FOSTIER, A. The gonadal steroids. In:Hoar WS, Randall DJ & Donaldson EM (Editors), **Fish Physiology**. Vol. 9. Part B. Academic Press, New York, 277-346. 1983.

GANECO, L. N. *et al.* Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 131-138, 2001.

GAZOLA, R.; BORELLA, M. I. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.30, n. 12, p. 1485-1487, 1997.

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

GONZÁLEZ, A.; PIFERRER, F. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 132, n. 2, p. 223–230, 2003.

GOYMANN, W.; WINGFIELD, J. C. Male-to-female testosterone ratios, dimorphism, and life history – what does it really tell us? **Behavioral Ecology**, Cary, v. 25, n. 4, p. 685–699, 2014.

GRIER, H. J. *et al.* Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. **American Journal of Anatomy**, New York, v. 159, n. 3, p. 331-345, 1980. DOI:10.1002/aja.1001590307. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aja.1001590307>. Acesso em: 13 jan. 2020.

GRIER, H. J. Celular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**, Utica, v. 21, n. 2, p. 345-357, 1981. DOI:10.1093/icb/21.2.345. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3882638?seq=1>. Acesso em: 15 jan. 2020.

GRIER, H. J.; URIBE, M. C.; PATIÑO, R. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)**. New Hampshire: Science Publishers, 2009. p. 25-84.

GRIER, H. J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: ANNUAL GULF AND CARIBBEAN FISHERIES INSTITUTE, 53., 2000, Fort Pierce. **Proceedings of the [...]**. Miami: University of Miami, 2002. p. 537-552.

GUYÓN, N. F. *et al.* Impairments in aromatase expression, reproductive behavior, and sperm quality of male fish exposed to 17 β - estradiol. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 5, p 935 – 940, 2012.

HALBE, W. H. Biossíntese dos estrogênios. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 226-234, 1965.

HAYASHI, Y. *et al.* High temperature causes masculinization of genecally female medaka by elevation of cortisol. **Molecular Reproduction and Development**. v. 77, n.8, p. 679 – 686. DOI: 10.1002/mrd.21203. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrd.21203> . Acesso em: 16 abr. 2020.

HESS, R, A. Estrogen in the adult male reproductive tract:a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 1, [art.] 52, [p. 1-14], 2003. Disponível em: www.RBEj.com/content/1/1/52. Acesso em: 20 fev. 2020.

HESS, R. A.; BUNICK, D.; BAHR, J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract: a review. **Molecular Cell & Endocrinology**, Limerick, v. 178, n. 1/2, p. 29–38, 2001.

HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G. Controle neuroendócrino da ovogênese em peixes teleósteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.86-93, jan./mar. 2017.

ICMBio - INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente; Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018. v. 1, 492 p.

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

KATZ, Y.; ECKESTEIN, B. Changes in steroid concentrations in blood of female *Tilapia aurea* (teleostei, cichlidae) during initiation of spawning. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 95, n. 4, p. 963–966, 1974.

KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. **Cytogenetics and Genome Research**, Basel, v. 101, n. 3/4, p. 289–294, 2003.

KOBAYASHI, T. *et al.* Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450_{scc}, P450_{c17}, P450_{arom}, and 3β-HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 292, n. 3, p. 573–577, 1998.

LAHNSTEINER, F. *et al.* Effect of 17β-estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 79, n. 2, p. 124–131, 2006.

LEE, Y.H. *et al.* Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 290, n. 7, p. 715–726, 2001.

LILEY, N.R. *et al.* Endocrine changes associated with spawning behavior and social stimuli in a wild population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 62, n. 1, p. 145-156, 1986.

LIMA, M. P. **Efeitos das mudanças climáticas sobre a expressão gênica e a fisiologia do tambaqui (*Colossoma macropomum*, cuvier, 1818)**. 2016. 152 f. Tese (Doutorado em genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. 2016.

LIMA, F. C. T. A revision of the cis-andean species of the genus Brycon Muller & Troschel (Characiformes: Characidae). **Zootaxa**, Auckland, v. 4222, n.1 p. 189, 2017.

LOPERA-BARRERO, N. M. **Diversidade genética de populações de Piracanjuba (*Bryconorbignyanus*) com a técnica de RAPD**. 2005. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2005.

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Bryconorbignyanus* 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.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Ecological Studies in Tropical Fish Communities**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. (Cambridge Tropical Biology Series).

LUCKENBACH, A. *et al.* Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder *Paralichthys dentatus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 216, p. 315-327, 2003.

MAGALHÃES, A.C. **Monographia brasileira de peixes fluviaes**. São Paulo: Graphicars. 260 p. 1931.

MARIA, A.N., *et al.* Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**. v. 260, n. 1-4, p. 298-306, 2006.

MARQUES, L.; *et al.* Vitrification of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) ovarian tissue containing immature oocytes. **Cryobiology**, v. 73, p. 442-443, 2016.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. H. *et al.* Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 472, p. 156-177, 2017.

MILIORINI, A. B. **Resfriamento e congelamento de embriões de dourado (*Salminus brasiliensis*), Piracanjuba (*Bryconorbignyanus*) e piapara (*Leporinus obtusidens*)**. 2012. 138p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MIURA, C.; HIGASHINO, T.; MIURA, T. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. **Biology Reproduction**, New York, v. 77, n. 5, p. 822–828, 2007.

MIURA, T.; MIURA, C. I. Molecular control of fish spermatogenesis. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 28, p. 181- 86, 2003.

MIURA, T. *et al.* Hormonal induction in all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 88, n. 13, p.5774–5778, 1991.

NAKAMURA, S. *et al.* Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost. **Science**, Washington, DC, v.328, n. 5985, p.1561-1563, 2010.

NAKAMURA, S. *et al.* Ovarian germline stem cells in the teleost fish, Medaka (*Oryzias latipes*). **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v.7, n. 4, p.403-409, 2011.

NINHAUS-SILVEIRA, A. *et al.* Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Bryconcephalus* (Gunther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 651-659, jul.2006.

OLIVEIRA, A. M. & VAL, A. L. Effects of climate scenarios on the growth and physiology of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characiformes: Serrasalminidae). **Hydrobiology**, v. 789, p. 167-178. 2017.

PAES, M. C. F., *et al.* Hatching, survival and deformities of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) embryos subjected to different cooling protocols. **Cryobiology**, v. 69, n. 3, p. 451-456, 2014.

PAIVA, M. P. **Grandes represas do Brasil**. Brasília, DF: Editerra, 1982. 292p.

PANARARI-ANTUNES, R. S. *et al.* Genetic variability of *bryconorbignyanus* (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, p. 839-848, 2011.

PARENTI, L. R.; GRIER, H. J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and Comparative Biology**, McLean, v. 44, n. 5, p. 333–348, 2004. DOI: 10.1093/icb/44.5.333. Disponível em: <https://academic.oup.com/icb/article/44/5/333/799541>. Acesso em: 20 jan. 2020.

PAVLOV, D.; EMEL'YANOVA, N. Reproductive dynamics: implications for assessment and management. *In*: JAKOBSEN, T.; FOGARTY, M. J.; MOKSNESS, E. (ed.). **Fish reproductive biology: implications for assessment and management**. New York: John Wiley, 2016. p. 50-97.

PEPLING, M.E.; DE CUEVAS, M.; SPRADLING, A.C. Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v.9, n. 7, p.257-262, 1999.

PIFERRER, F. Determinación y diferenciación sexual en los peces. *In*: ESTÉVEZ, M. A. C. (coord.). **La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009. p. 247-336.

PRAT, F. *et al.* Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 78, n. 3, p. 361-373, 1990.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I. *et al.* A new approach to oocyte development in *Ostariophys*. **Animal Biology of Reproduction**, [S.l.], v.6, p.269, 2009.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I. *et al.* Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 272, n. 11, p.1290-1306, 2011.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr.(org.). **Check list of freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.742p.

RINCHARD, J. *et al.* Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the gudgeon *Gobiogobio L*; (Teleostei, Cyprinidae). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 92, p. 168–178, 1993.

RINGUELET, R. A., ARAMBURU, R.H., ARAMBURU, A. A. **Los peces argentinos de água dulce**. La Plata: Comision de Investigacion Cientifica. 602 p. 1967.

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

ROTILI, D. A. **Esteróides sexuais em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2018. 110 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

SANTOS, E. M. *et al.* Gonadal transcriptome responses and physiological consequences of exposure to oestrogen in breeding zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 15, n. 83 (2), p. 134 – 142, 2007.

SCHULTZ, I. R. *et al.* Short-term exposure to 17 alpha-ethynylestradiol decreases the fertility os sexually maturing male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 1271 – 1280, 2003.

SGNAULIN, T. *et al.* Biofloc technology (BTF): an alternative aquaculture system for piracanjuba *Brycon orbignyanus*? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 485, p. 119-123, Fev.2018.

SILVA, D. H. S. *et al.* Preliminary study on testicular germ cell isolation and transplantation in na endangered endemic sprecies *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht,2019. Online. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10695-019-00631-8.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2020.

TAGHIZADEH, V.; IMANPOOR, M. R.; MEHDINEJAD, N. Study the seasonal steroid hormones of common carp in Caspian Sea. **SpringerPlus**, [Switzerland], v. 2, n. 1, [art.]193, 2013.

TAYLOR, R.G.; GRIER, H.J.; WHITTINGTON, J.A. Spawning rhythms of common snook in Florida. **Journal of Fish Biology**, London, v.53, [art.] jb980721, p.502-520, 1998.

TILTON, S. C.; FORAN, C. M.; BENSON, W. H. Relationship between ethinylestradiol-mediated changes in endocrine function and reproductive impairment in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 2, p 352 – 359, 2005.

TRUDEAU, V.L. Comparative neuroendocrinology: integration of hormonal and environmental signals in vertebrates and invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v.144, n. 3, p.243-246, 2006.

URIBE, M. C. H.; GRIER, J.; MEJÍA-ROA, V. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. **Spermatogenesis**, Philadelphia, v. 4, n. 3, [art.] e983400, 2015.

VAZ. M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000.

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

VAZZOLER, A. E. A. M. & MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei: Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, p. 627-640, 1992.

VERNETTI, C. H. M. M. *et al.* Genes involved in sex determination and the influence of temperature during the sexual differentiation process in fish: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 12 (17), p. 2129 – 2146, 2013. DOI: 10.5897/AJB12.1155.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/256186425_Genes_involved_in_sex_determination_and_the_influence_of_temperature_during_the_sexual_differentiation_process_in_fish_A_review . Acesso em: 15 abr. 2020.

WALLACE, R. A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. *In*: BROWDER, L. W. (ed.). **Developmental biology**: a comprehensive synthesis. New York: Plenum Press, 1985. v. 1, p. 127–177.

WALLACE, H.; BADAWY, G. M. I.; WALLACE, B. M. N. Amphibian sex determination and sex reversal. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 55, p. 901–909, 1999.

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

ZANIBONI FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory fishes of the Uruguay river. *In*: CAROLSFELD, J. *et al.* (ed.). **Migratory fishes of the South America**: biology, social importance and conservation status. Ottawa: World Fisheries Trust, 2003. p. 157-194.

ZANIBONI FILHO, E. *et al.* **Catálogo ilustrado de peixes do alto rio Uruguai**. Florianópolis: Editora da UFSC/Tractebel Energia. 128p. 2004.

ZARDO, E. L. **Diferenciação sexual, estrutura populacional e ciclo reprodutivo de piracanjuba (*Bryconorbignyanus*) sob condições de cultivo**. 2018. 118 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

ANEXO 1- *Journal of Fish Biology* instruções para autores

Instructions for authors (updated may 2019)

Thank you for your interest in the *Journal of Fish Biology* (JFB). We look forward to handling your submission. Please carefully follow these instructions to avoid unnecessary delay and possible rejection of your paper on technical grounds. Swift consideration of your initial submission is possible because exact formatting of your manuscript to JFB style is necessary only after review and provisional acceptance for publication.

Aims and scope

The aim of JFB is to publish exciting, high quality science that addresses fundamental questions in fish biology. All submissions must be original and not simultaneously submitted to another journal.

We publish four categories of papers:

An Original Research Article: This contains new biological insight into any aspect of fish biology, particularly those that report results and ideas of interest and value for our wide international readership. Hence, the novelty of the content of manuscripts should have relevance beyond a particular species or place in which the work was carried out.

A Brief Communication: This covers any subject within the scope of JFB but should be confined to a single topical point or issue of progress, such as an unusual occurrence, an interesting observation, a timely finding or an important technical advance. Again, relevance beyond the species or locality under consideration is needed..

A Review Article: This is a concise, critical and creative article that synthesizes and integrates available knowledge, and that stimulates topical debate and new research. Authors should submit a synopsis (two pages maximum) of their paper to an Associate Editor for consideration before submission.

An Opinion Piece presents a brief commentary on a topical or emerging issue in Fish Biology that has broad readership appeal.

A Comment to the Editor: A brief comment on a recently published research paper in JFB may be submitted for publication to the Editor-in-Chief. If accepted, it will be sent to the original authors to provide an opportunity for a Reply that will be published along with the comment.

The following topics are usually not considered for publication in JFB:

- Commercial fishery stock assessment.
- Basic studies on diet, reproduction, aquaculture techniques, new aquaculture species or toxicology for a single species or a narrow geographic area, unless they have broader significance/interest.

- New markers, unless they are accompanied by detailed work focusing on their usage and addressing relevant biological questions (e.g. population structuring, parentage and genetic mapping).

Special Issues of JFB are published regularly. These Special Issues comprise a coherent set of submissions on an emerging topic or theme that is of interest and value for our wide international readership. Special Issues are typically commissioned by the Editorial Team. In addition, an annual Special Issue presents key contributions that have been presented as part of the annual FSBI Symposium. Other Symposia are not normally considered for a Special Issue, especially if the topic is narrow. All the same, JFB welcomes a limited number of keynote contributions from conferences. These would be submitted as either a Regular Article or an Opinion, and provision would be made to acknowledge the title and location of the Symposium in published articles.

Submission process

A submission to JFB implies that the content has not been submitted for publication elsewhere or previously published except as either a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting/symposium or in a MSc/PhD thesis. JFB allows for the submission of articles previously available as preprints on servers provided they are non-commercial (such as ArXiv, bioRxiv, etc.). Authors may also post the submitted version of their manuscript to non-commercial servers at any time. If the article is accepted for publication in JFB, authors will be requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

All categories of manuscripts are submitted online at <http://jfb.edmgr.com>, where a user ID and password are assigned on the first visit. Full instructions and support are available on this site. During submission, the manuscript text (with pagination, line numbering and a legible 12 pt font size) is uploaded as a text file (not as a .pdf). Separate files for any Tables (text files) and Figures (image files) are uploaded to the website independently. Authors must identify an appropriate subject area ('Select Section/Category section) to assign a handling editor and suggest five potential referees ('Suggest Reviewers' section). Referees are expected to be established experts in the field and be independent of the research under consideration, including the source of funding and the authors' institutions. We strongly recommend that authors use an ORCID iD (a unique author identifier) to help distinguish your work from that of other researchers (for more details visit: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/submission-peer-review/orcid.html>). If you experience difficulty with your submission, please contact the Editorial Office at: JFBoffice@wiley.com (see Section 7).

Preparing your submission

Article Preparation Support

Wiley Editing Services offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for Preparing Your Article for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Preparing an Original Research Article

Accepted papers will be converted to UK English (the standard is the Concise Oxford English Dictionary) during the production process, with the exception of exact quotations contained within quotation marks. Latin words, e.g., a genus and species, appear in italics. All text is double spaced and lines are numbered.

A cover letter is not mandatory.

An Original Research Article will have the following 12 essential parts.

Title page

The title page must contain the following information:

Title of the paper, which should be short, informative and avoid any geographical or regional references, unless they are fundamental to the scientific thrust of the paper. If a species name is used in the title, we require a common name (if available) followed by the full scientific name. Avoid the use of abbreviations unless they include the name of a group that is best known by its acronym (e.g., CONSORT statement). See Wiley's tips for search engine optimization: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/Prepare/writing-for-seo.html>;

The family (or formal) name by which each author is known plus the given or familiar names and any initials (see Section 6 for criteria on author eligibility);

The address in full of each author's primary affiliation (research institute, university, city, state/province, country) as a numbered list below the Author list;

The corresponding author's name, full postal address and email address.

An author's current address can be listed here if different from that at the head of the page.

Funding Information is listed here.

Joint first and/or senior authorship can be indicated by stating in a footnote that 'X and Y should be considered joint first author' or '... made an equal contribution to this work'.

Abstract and Key Words

The Abstract must be a concise and accurate summary of the significant findings of the paper without any introductory or contextual information. Abstracts should not be structured with headings. Methods can be identified only as part of a result (e.g., Respirometry revealed that exercise increased...; GWAS identified a significant number of SNPs...). A species name in the Abstract appears as in the title, a common name (if available) followed by the full scientific name.

Provide a list of up to 6 descriptive Key Words (maximum 100 characters) in alphabetical order. Specific geographical (e.g., Baffin Island, Amazon Basin) or regional references (e.g., south-east Asia) can be included here. Keywords are listed underneath the abstract and separated by commas.

Introduction

The Introduction alerts readers to literature relevant to the research discovery so that the originality of the research cannot be easily assigned. Also, the Introduction must state the intent of the research in the form of a research question or hypothesis so that no confusion arises as to what advance in fish biology is being sought. Footnotes to the text are not allowed.

Text citations of references use the style “author, date” and multiple references are list in alphabetical order.

For example: ‘...as demonstrated by McKenzie (2001) and by McKenzie and Farrell (2010)’; ‘...as suggested previously in some works (Sloman, 2010), but not others (McKenzie and Farrell, 2010)’; ‘...consistent with earlier studies (Blaber, 1975, 1988; Lujan, 2011a,b; Prodöhl, 1988)’. Three or more authors are cited with the name of the first author followed by et al. (in italics): e.g., (Sloman et al., 2002) or Sloman et al. (2002). Authors sharing the same surname and year of publication are distinguished by their initials: e.g., (Young, L., 2012; Young, T., 2012).

Materials and Methods

The Materials and Methods may contain up to two levels of sub-headings and must provide sufficient detail so that the work can be replicated by others. Established methods can be simply referenced, preferably acknowledging the original work (rather than a recent user of that method), even if minor methodological changes were made (which should be described). Materials and Methods must also include information on how observations were analysed to derive the quantitative results. Statistics should be based on independent biological samples. Technical replicates should be averaged before statistical treatment and not used to calculate deviation parameters. In the case of multiple comparisons (e.g., microarray data), the probability of false positives should be considered in the analysis. Citations to tables, figures, and equations are capitalized and not contracted (e.g., Table 1, Figure 3, Equation 5). Parts of figure should be in lowercase (a), (b), etc., in legend as well as in the figure. For example: Figure 1; Figure 2a; Figure 1a–c; Figures 2a–d and 5.

Results

The Results section presents a concise and accurate description of the results of the research. It may contain up to two levels of sub-headings. Figures and Tables, which are numbered consecutively in order of their mention in the text, increase the clarity and conciseness of the result presentation; excessive duplication of material in text, figures and tables is not permitted. All statements concerning quantitative differences between experimental conditions require quantitative data and adequate statistical treatment. The deviation parameter, the number of biological samples and the statistical procedures should be provided for each dataset either in the main text or as part of a Figure or Table.

Discussion

The Discussion, which may contain up to two levels of sub-headings, places the results of the study into a broader context so that the significance, quality and novelty of the work can be established with respect to existing literature. The Discussion should

directly address the original research question or hypothesis, as stated in the Introduction. Excessive repetition of results is not permitted. The potential for future work or a brief perspective on the findings can be included.

Acknowledgements

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed here without titles or honorifics, e.g., A. P. Farrell, but not Prof. Tony Farrell. Thanks to editors and anonymous reviewers are not appropriate. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Contributions

The contributions of each author, including ideas, data generation, data analysis, manuscript preparation and funding, must be listed here using their initials only, e.g., A. P. F..

Significance Statement

The Significance Statement (no more than 75 words) will ultimately appear directly below the online title within the online table of contents (it is not in the published paper). It will be available for reviewers as part of the peer review process and should concisely and accurately explain the significance and relevance of the findings of the study to a broad readership. Suggested content includes: an introductory sentence and/or why a problem/unanswered question was important to address; what has been shown/what does the manuscript do to fill a gap in our knowledge; what it means to the field as a whole. A Significance Statement may undergo editorial revision.

References

All published citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list, which includes all key elements of each reference, including the names of journals in full (not abbreviated). Authors are responsible for checking the accuracy of their references. Manuscript submissions are not required to use JFB reference formatting until the article is provisionally accepted. Corrections may be made during the publication process. A manuscript title must appear exactly as in the original publication. JFB uses APA style referencing with some minor style changes. Examples of JFB reference content requirements are shown below.

Journal Article:

Flowers, K. I., Henderson, A. C., Lupton, J. L., & Chapman, D. D. (2017). Site affinity of whitespotted eagle rays *Aetobatus narinari* assessed using photographic identification. *Journal of Fish Biology*, 91, 1337– 1349
Gill, A. B. (2003).

The dynamics of prey choice in fish: The importance for prey size and satiation. *Journal of Fish Biology*, 63, 105– 116

Online Article Not Yet Published in an Issue:

Mussen, T. D., & Cech Jr, J. J. (2018). Assessing the use of vibrations and strobe lights at fish screens as enhanced deterrents for two estuarine fishes. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jfb.13776>

An online article is cited by its Digital Object Identifier (DOI), which remains valid and allows article tracking even after its allocation to an issue. It has no volume, issue or page numbers.

Book:

Halver, J. E., & Hardy, R. W. (2002). Fish nutrition. San Diego, CA: Academic Press

Chapter in a Book:

Mench, J. A., & Mason, G. J. (1997). Behaviour. In M. C. Appleby & B. O. Hughes (Eds.), Animal Welfare (pp. 127– 142). New York, NY: CAB International

Docotral Thesis: These must have a permanent record of where they are held (e.g., thesis has been lodged at the individual's University or Institution Library as a permanent addition to the collection there), e.g., Al-Badran, A. A. (1987). Factors influencing river bank stability in the Tigris and Shatt Al- Arab water ways, Iraq (Doctoral thesis, University of Dundee, UK).

Retrieved _____ from
<https://ethos.bl.uk/Home.do;jsessionid=DA702A005B56B131D4E776CD6A605544>

Master's Thesis: These must be readily available electronically and the URL provided, e.g., Cox, G. K. (2010). Anoxic survival and cardiovascular responses of the Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii* (Masters thesis). Available from UBC Library <https://open.library.ubc.ca/> .

Electronic References: These include references not subject to peer review and formal publication and can be set out as shown given below. ICES (2016). Report of the Baltic salmon and trout assessment working group (WGBAST). ICES CM 2016/ACOM:09. Available _____ at:
http://ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Expert%20Group%20Report/acom/2016/WGBAST/wgbast_2016.pdf

Marshall, A., Bennett, M. B., Kodja, G., Hinojosa-Alvarez, S., Galvan-Magana, F., Harding, M., Stevens, G. & Kashiwagi, T. (2011). *Manta birostris*. In IUCN Red List of Threatened Species Version 2013.2. Available at <http://www.iucnredlist.org/details/198921/0> (last accessed 9 December 2013).

Tables

Tables complement but do not duplicate information contained in the text. If required, they are submitted as a separate text files (not pasted as images). Tables contain no vertical lines and are numbered consecutively in order of appearance in the text. The table caption is concise and descriptive, and understandable without reference to the main text. It includes the full scientific name(s) of the species to which the table relates. Statistical measures, such as SD or SE, should be identified in the caption. Dimensions

for the units should appear in parentheses in the column headings and not in the legend or body of the table. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values.

Figures

Figures complement information contained in the text, but without unnecessary duplication. Figures that contain data are intended to accurately, clearly and concisely represent the research results, while other figures may better orientate the reader, e.g., maps.

Preparing Figures

Figures are submitted in digital format and as separate files. Native file formats are not accepted. Figures are numbered consecutively in order of appearance in the text. A wide variety of formats, sizes and resolutions of high quality figures are accepted for initial peer review. More information is found at: https://authorservices.wiley.com/asset/photos/electronic_artwork_guidelines.pdf

Line artwork (vector graphics) are prepared in black and white with shades of grey, unless colour is essential for clarity. Error bars must be included and the method used to derive them explained in the caption. Line artwork must be saved as Encapsulated PostScript (EPS) file.

Photographs should illustrate something that cannot adequately be displayed in any other manner. Electron and light microscope photographs must embed a magnification as a scale bar. Staining techniques should be described in the caption. Photographs must be saved as bitmap files (half-tones or photographic images) as Tagged Image Format (TIFF) file. Maps and charts should be contained within a frame and show either a latitude and longitude or a single co-ordinate (N, S, E or W). JFB use The Times Concise Atlas of the World. London: Times Books as its standard for geographical names, countries, seas, rivers, etc.

Figure captions

A Figure caption is a concise and self-contained description of the figure that can be understood without reference to the main text. Figure captions are submitted as a separate text file along with the Figures. They begin with a short title for the figure, which include the full scientific name(s) of the species to which the illustration relates. Any lines fitted through data points in the figure must be statistically significant and be supported by the mathematical equation and statistical information (P-values and R² or R values). Keys to the symbols, formulae and regression values can be included in the figure itself or the caption, but not both. The minimum reduction for a figure may be indicated. If material has previously been published, authors must obtain permission from the copyright owner (usually the publisher) to use such material and cite the author in the caption (or text), e.g., 'Reproduced with permission from Blaber (1975)'. (This requirement also applies to the reproduction of a previously published Table or an extended quotation from material.)

Supporting Information

When appropriate, submissions may include Supporting Information specifically files containing videos and animations, and long datasets, tables and figures. Supporting Information contains information that is not essential to the article but is a valuable addition by providing greater depth and background. Supporting Information will be reviewed, will appear without typesetting and be hosted only online. The availability of Supporting Information is indicated in the main text after the Acknowledgements, headed "Supporting Information". Short captions list the titles of all supporting material. Supporting Information should be supplied as separate files, and not incorporated into the main manuscript text file. Wiley's FAQs on Supporting Information is found at: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/Prepare/manuscript-preparation-guidelines.html/supporting-information.html>

Preparing a Brief Communication

A Brief Communication is confined to a single point or issue of progress such as an unusual occurrence, an interesting observation, a particularly topical and timely finding or an important technical advance. The point or issue must have relevance beyond the species or locality under consideration. First records should adhere to best practices proposed by Bello et al. (2014. A proposed best practice approach to overcome unverified and unverifiable "first records" in ichthyology. *Cybium* 38, 9-14) and should strive to aggregate and report regional historical records for the same species. JFB no longer considers short technical notes describing molecular markers (e.g., microsatellites). A Brief Communication is limited in length (no more than 5 printed pages; c. 2500 words of text) and normally includes no more than one (multi-panel) figure and one table. It follows the same format as Research Articles with respect to the Title, Authors and Affiliations, Abstract, Key Words, Statement of Significance, Acknowledgements and References (see Section 3.1), but the main text is written in freeform without any headings. The Abstract is no more than 90 words.

Preparing a Review Article

Prospective authors will submit a synopsis (two pages maximum) of their article to an Associate Editor or the Editor-in-Chief. The synopsis should outline why the review is topical, its main points and objectives, and how it will stimulate debate and research. When the proposal has been accepted, the authors will submit a manuscript within a mutually agreed upon time and page limit.

Preparing an Opinion Piece

An Opinion Piece presents a brief, personal view on a topical or emerging issue in Fish Biology that has broad readership appeal. It may be offered to or commissioned by the Editor-in-Chief. The submission includes a Title page, Main Text and References. It contains no Abstract or Key Words but can contain Tables or Figures. It will be peer reviewed.

Preparing a Comment to the Editor

Comments are no more than c. 750 words of text and deal with single significant finding or point for discussion concerning a recent published paper in JFB and needs rapid publication. The submission includes a Title page, Main Text and References (maximum four). It contains no Abstract, Key Words, Tables or Figures. After satisfactory peer review, it will be sent to the original corresponding author for a Reply.

The reply will take the same form and will be peer reviewed. Publication will end the debate.

Ethical considerations

Ethical considerations for the use of animals

JFB takes its responsibility towards animal welfare very seriously, whether it concerns fish collection, predator-prey interactions or invasive surgical procedures. At the same time JFB recognizes that permitting requirements for animal collections and animal welfare have regional differences and therefore may not be exactly the same as those stipulated in the United Kingdom, which is the home of JFB.

Therefore, when a research paper that involves animal experimentation or harm is submitted to JFB, authors are accepting and acknowledging that appropriate permits for animal collections and animal welfare issues were sought and approved by the local committee(s) responsible for such permits. If a submission is received from a country where no such permitting is required, then any decision with regards to ethics rests solely with the Editor-in-Chief, who will seek advice from the Editorial Team, referees and other qualified scientists as needed.

Furthermore, as specific evidence of the permitting, a clear ethical statement must be provided in the Materials and Methods under a subheading Ethical Statement for any submissions to the JFB. This statement may take a form similar to the following:

The care and use of experimental animals complied with [Insert the local or national body] animal welfare laws, guidelines and policies as approved by [Insert the local or national permitting authority and the permit reference number].

Independent of any such permits, the JFB still reserves the right to reject papers on an ethical basis should valid concerns emerge from the contents of the research paper. Therefore, it is essential that within their ethical statement authors clearly identify any welfare implications arising from their experimental design including steps taken to minimise impact on fish welfare. Studies which may require additional information in the ethical statement include (but are not limited to) those where: fishes were collected as part of faunal surveys; experimental conditions caused severe distress or lasting harm to sentient fishes (e.g. predation studies, toxicity testing, disease trials); surgical procedures were used; sentient un-anaesthetised animals were subjected to chemical agents that induce neuromuscular blockade, such as muscle relaxants. In addition, ethical statements should say whether fishes were killed at the end of the experiment (e.g. for tissue sampling).

Ahead of submission, authors will benefit greatly from reading our Editorials on animal welfare: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0022-1112.2006.01035.x/full> (2006) and <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8649.2010.02900.x/full> (2011).

If the research did not involve animal experimentation or harm, and required no permits then no ethical statement is required.

Publication Ethics

The Fisheries Society of the British Isles (FSBI) considers that scientists should avoid research threatening the conservation status of any species of fish that is already regarded as threatened according to the IUCN Red List of Threatened Species and the associated current Red List Categories and Criteria (<http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria>) or which is listed as such in a Red Data Book appropriate to the country or geographical area concerned. In accordance with this view, papers based on such research will not be accepted, unless the work had clear conservation objectives.

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work. Any person listed as an author, by definition, will have contributed substantially to the article's conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data. All listed authors will be contacted by email after a manuscript is submitted to confirm their contribution. Listed authors should meet the following criteria:

Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; given final approval of the version to be published and have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content;

Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and

Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript. (<https://www.crossref.org/services/funder-registry/>).

How individual authors specifically contributed to the work is listed in the Contributions statement (see Section 3.8).

Editorial policies and journal style

As JFB serves an international community of fish biologists, some conventions are required that deviate from the APA style. For a full explanation of style requirements for JFB, with examples, please [click here](#).

Abbreviations and acronyms:

All abbreviations and acronyms in the text and in all figure and table captions must be given in the fully expanded form on first mention and abbreviated thereafter, except for the small number of abbreviations and acronyms that are scientifically accepted, e.g., DNA. Useful resources are:

BSI (1967). Recommendations for Letter Symbols, Signs and Abbreviations: BS 1991, Part I. London: British Standards Institute.

Baron, D. N. (Ed.) (1977) Units, Symbols and Abbreviations. A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, 3rd edn. London: The Royal Society of Medicine.

Units: Physical measurements only use metric units in accordance with the Systeme International d'Unites (SI), e.g., m, mm³, s (h and day are acceptable), g, m s⁻¹, g l⁻¹, mg l⁻¹ (not ppm), J (not calories).

The 24-h clock is used for time of day, e.g., 1435 hours, not 2.35 p.m. Calendar dates use day month year, e.g., 15 June 1998. Salinity has no units; do not use psu, ‰ or similar. Ship's speed is given in km h⁻¹; knots (nautical miles h⁻¹) can follow in parentheses. Latitude and longitude can be given either as degrees minute seconds, or decimal degrees, at a level of precision proportionate to the accuracy of the fix. (0.1 second of latitude is equivalent to 185 m, but this decreases for longitude by the cosine latitude).

Statistics, equations & mathematical expressions: A useful resource for equations and mathematical expressions:

Journal of Fish Biology 82, 1771–1772 DOI: 10.1111/jfb.12146 (2013); A useful resource for reporting statistics: Journal of Fish Biology 78, 697–699 DOI: 10.1111/j.1095-8649.2011.02914.x (2011)

Where decimal values are given, the number of decimal places must reflect the accuracy of the work. Thus, means and error (S.D., S.E., 95% C.L., etc.), should have the same number of decimal places, e.g., 15.1 + 0.2 and not 15.1 + 0.19. In mathematical expressions, italicized single letters are used for dimensions, qualified by subscripts (roman) as required, e.g., mass (not weight) M, wet mass (MW), length L, fork length LF (not FL), standard length LS, index I, gonadosomatic index IG, hepatosomatic index IH, etc.

Statistics are presented as follows: name of test, test statistic with associated degrees of freedom (d.f.; N.B. an F distribution has two d.f. values) and probability level (P). Although ANOVA and regression are robust, the real P-values are likely to be different from the precise values provided by the statistics program, because of violations of the assumptions. If the manuscript clearly states that data conform fully to all the assumptions of the statistical method used, then precise P-values can be cited with three decimal places. Otherwise, P-values are normally limited to: > 0.05, 0.05, 0.01 and 0.001. Confidence intervals (95% C.I.) can be provided for parameters estimated by ANOVA and regression analysis. Where numerical resampling (e.g. bootstrapping) is used to assess the statistical significance of a given parameter (e.g. FST), in addition to resulting confidence intervals, the number of replicates should be also provided (e.g. 1000 bootstrap replicates).

Species nomenclature, authority and nomenclature: The plural of more than one individual of a single species is 'fish', but it is 'fishes' if there is more than one species.

After its first mention, a fish species is only referred to by its scientific name. There should then be no further reference to the common name, describing author or date. The genus name can be abbreviated to a single letter (e.g., *C. carpio* and *O. mykiss*), except either at the start of a sentence, or where confusion arises from multiple genera with the same first letter, when either the genus is given in full, or the first three letters of the genus is used to provide a clear distinction.

First use of a fish species name in the Title and Abstract must include common (if available) and scientific name without describing the authority and date of authorship. First mention of a fish species in the main text must include the common name (if available), the binomial scientific name (in italics) and the describing authority and date of authorship, e.g., rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792), not (Walbaum, 1792). Naming authorities must appear in full except Linnaeus, 1758, e.g., Atlantic salmon *Salmo salar* L. No commas are necessary to separate either the common name from the species, or the authority from the date. The use or absence of parentheses around the naming authority's name and date is covered by strict scientific rules. If the current accepted genus and species name is the same as that given by the original naming author, the name appears without parentheses, e.g., *Pleuronectes platessa* L. 1758, but if the current accepted scientific name differs from that given by the original naming author, the original author's name appears within parentheses, e.g., *Platichthys flesus* (L. 1758).

For correct scientific names and formatting of naming author please use the following:

Eschmeyer, W. N. (Ed.) Catalog of Fishes electronic version (15 November 2013). <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

For accepted common names of fishes:

Wheeler, A. (1992). A list of the common and scientific names of fishes of the British Isles. *Journal of Fish Biology* 41(Suppl. A), 17–26. doi: 10.1111/j.1095-8649.1992.tb05644.

Wheeler, A. C., Merrett, N. R. & Quigley, D. T. G. (2004). Additional records and notes for Wheeler's (1992) List of the Common and Scientific Names of Fishes of the British Isles. *Journal of Fish Biology* 65(Suppl. B), 1–40. doi: 10.1111/j.0022-1112.2004.00583.x

Nelson, J. S., Crossman, E. J., Espinosa-Perez, H., Findley, L. T., Gilbert, C. R., Lea, R. N. & Williams, J. D. (2004). Common and scientific names of fishes from the United States, Canada, and Mexico, 6th edn. Special Publication 29. Bethesda, MD: American Fisheries Society.

Froese, R. & Pauly, D. (Eds) (2013). FishBase. World Wide Web electronic publication. Available at <http://www.fishbase.org/Search.php>

FAO (2013). ASFIS List of Species for Fishery Statistics Purposes. Rome: Fisheries & Aquaculture Department, FAO. Available at <http://www.fao.org/fishery/collection/asfis/en>

Synonyms for a species

Synonyms require the following style: *Eptatretus cirrhatus* (Forster 1801) *Homea banksii* Fleming 1822: 375 (original description; type locality: South Seas; holotype: unknown); *Bdellostoma heptatrema* Muller 1836: 79 (original description; type locality: South seas; holotype: unknown); *Bdellostoma forsteri* Muller 1836: 80 (original description; type locality: Queen Charlotte Sound, New Zealand; holotype: unknown). Conel, 1931: 76 *Bdellostoma forsteri* var. *heptatrema*. Muller, 1838: 174 (new combination); *Bdellostoma cirrhatum*. G^unter, 1870: 511 (in part). Hutton, 1872: 87 (in part). Putnam, 1874: 160 (in part); Gunther, 1880: 27. (Note that species names that are modifications of an existing binomial, rather than an original description, are separated from the author name by a full stop, *Bdellostoma cirrhatum*. Gunther, 1870: 511 (in part). [based in part on: Mincarone, M. M. & Fernholm, B. (2010). Review of the Australian hagfishes with description of two new species of *Eptatretus* (Myxinidae), *Journal of Fish Biology* 77, 779–801. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02661.x]

New species: The International Code of Zoological Nomenclature (Article 8.5, amendment) requires that a work bearing a new taxonomic name, issued and distributed electronically must be registered in the Official Register of Zoological Nomenclature (ZooBank) and contain evidence in the work itself of such registration. Any manuscript dealing with the description of new species, genera, or family submitted to JFB must be registered in ZooBank and the name of each new taxonomic name (e.g., new family, genus or species) should be added to ZooBank. Read <http://zoobank.org/> and associated video tutorials (<http://zoobank.org/VideoGuide>) and the Editorial on this subject in JFB 90, 1167–1169.

Curation of taxonomic specimens

Name-bearing type specimens of taxa that are described in JFB as new to science must be deposited in recognized national or international institutions that can meet ICZN (2012) criteria for Recommendations 72F.1-5 into the foreseeable future: ICZN (2012). The International Code of Zoological Nomenclature, 4th edn. London: The International Trust for Zoological Nomenclature 1999.

Other specimens used for taxonomic analyses should, wherever possible, be deposited in appropriate scientific collections (e.g., museums and university collections, or private collections when there is good evidence that these are adequately maintained), with identifying catalogue numbers, so that they are accessible to the scientific community for subsequent examination and taxonomic revision <http://iczn.org/iczn/index.jsp>.

Distribution of paratype series among more than one recognized national or international institution is at the discretion of the authors, but is encouraged for paratype series whenever the paratype series can be split into two or more representative samples for deposit at different institutions. Institutions and their official abbreviations are listed in Eschmeyer's Catalog of Fishes Online : <https://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes> and in Poss, S. G. & Collette, B. B. (1995). Second survey of fish collections in the United States and Canada. *Copeia* 1995, 48–70. <http://www.jstor.org/stable/1446799>

Genetic nomenclature: Authors are responsible for ensuring correct style for naming genes, etc. to avoid delay publication at the final proofreading stage. To differentiate genes, proteins etc., by fish origin, JFB uses the zebrafish system: <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>.

Sequence data: Descriptions of novel amino-acid sequences of proteins or novel nucleotide sequences (e.g., primer sequences) are only be accepted if they carry a statement that all the data have been deposited with an appropriate data bank, e.g., the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) or GenBank Data Libraries, and the database accession number must be given in the Materials and Methods. Data deposited in genetic data banks should include: specimen catalogue numbers (for specimens preserved in collections); a note identifying sequences that are derived from type specimens; and the collection locality data. For taxonomic papers that refer to sequences derived from specimens preserved in collections, authors should include a Table that clearly links each sequence accession number with the specimen from which it was derived. Sequences from type specimens should be clearly identified by bold text in this table and the significance of the bold text explained as a table footnote. For appropriate nomenclature for genetic sequences of type specimens please see: Chakrabarty, P. (2010). Genotypes: a concept to help integrate molecular phylogenetics and taxonomy. *Zootaxa* 2632, 67–68. <http://www.mapress.com/zootaxa/2010/f/zt02632p068.pdf>. Sequences from holotypes are identified as hologenotypes, those from topotypes are topogenotypes, and the genetic marker(s) used are incorporated into the nomenclature (e.g., paragenotype ND2). Lengthy nucleotide sequences will only be published in the text if, in the judgement of the Editorial Team, these results are of general interest and importance. Where sequences are already published, reference to the original source will suffice.

RAPD –randomly amplified polymorphic DNA: Papers submitted to JFB must not include data generated by RAPD technology because conclusions derived from them may be unreliable.

Editorial office contact details

Editorial Assistant: Lia Curtin

Email: JFBoffice@wiley.com

VITA

Helena Robattini Carvalho, nascida no dia 04 de outubro de 1993, na cidade de Porto Alegre, filha de Pedro Germano Esser Carvalho e Maria da Graça Robattini Carvalho. Coursou ensino fundamental e médio no Colégio Dom Feliciano, em Gravataí, concluindo seus estudos em 2010. Ingressou no curso de Ciências Biológicas com Ênfase em Biologia Marinha e Costeira (Bacharelado), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, permanecendo apenas no ano de 2011. Em 2012, ingressou no curso de Medicina Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde estagiou nas áreas de clínica de grandes animais, reprodução equina, produção de bovinos de corte, inspeção de carnes e aquicultura, concluindo a graduação em 2017. No ano de 2018, obteve aprovação no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Professor Danilo Pedro Streit Jr., obtendo bolsa de estudos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.