
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Jaqueline Cristina de Bem

DESENVOLVIMENTO GONADAL INICIAL E REVERSÃO
SEXUAL EM *Astyanax altiparanae* (TELEOSTEI,
CHARACIDAE)

Rio Claro, SP
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

Jaqueline Cristina de Bem

DESENVOLVIMENTO GONADAL INICIAL E REVERSÃO
SEXUAL EM *Astyanax altiparanae* (TELEOSTEI,
CHARACIDAE)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Ciências Biológicas na área
de Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Patricia Pasquali Parise Maltempi

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Rio Claro, SP

2009

597 Bem, Jaqueline Cristina de
P455d Desenvolvimento gonadal inicial e reversão sexual em
Astyanax altiparanae (Teleostei, Characidae) / Jaqueline
Cristina de Bem. – Rio Claro : [s.n.], 2009
96 f. : il., tabs., gráfs., fots.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Patricia Pasquali Parise Maltempi
Co-orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Peixes. 2. Lambari. 3. Diferenciação sexual. 4.
Feminização. 5. Estrógeno I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO defendida em 07/05/2009

Prospecção Desenvolvimento gonadal inicial e reversão sexual em *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae)

JAQUELINE CRISTINA DE BEM

COMISSÃO EXAMINADORA:



Profª. Drª. Carmem S. Fontanetti Christofolletti



Profª. Drª. Rosicleire Veríssimo Silveira



Profª. Drª. Yara Aiko Tabata

DEDICATÓRIA

Não apenas esse projeto, mas todas as minhas conquistas profissionais são dedicadas aos meus pais, Genésio e Silvianita, e minha irmã, Juliana, que em nenhum momento deixaram de me apoiar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, pelas pessoas que me rodeiam e pela inspiração espiritual que me tem permitido cumprir minha jornada.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Patricia Pasquali Parise Maltempi, pela orientação, incentivo, compreensão e, sobretudo, pela convivência amigável.

A Prof^a. Dr^a. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, pela co-orientação, atenção e disponibilidade.

Aos professores da banca examinadora pela gentileza da participação e pelas correções necessárias.

Ao CEPTA/ICMBio, na pessoa do Sr. Chefe Laerte Batista de Oliveira Alves, por permitir a utilização das instalações e equipamentos da Instituição e ter cedido os peixes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Augusto Senhorini mestre e amigo de ontem, hoje e sempre, que guiou meus passos durante grande parte de minha vida acadêmica, o meu respeito e eterno agradecimento.

Ao técnico João Caetano dos Santos Neto, pela atenção, amizade e grande presteza durante a fase experimental.

A Msc. Maria Angélica Rosa Ribeiro e ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Ceccarelli pela amizade e pelas agradáveis conversas que sempre me ajudaram a esclarecer idéias.

A todos amigos do CEPTA pela forma carinhosa e generosa a qual sempre me receberam, em especial a Rita de Cássia Gimenez de Alcântara Rocha, Luis Alberto Gaspar, Sandoval dos Santos Júnior e Saulo dos Reis.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e a todos companheiros da UNESP de São José do Rio Preto (IBILCE) que me auxiliaram durante a realização do estudo de desenvolvimento gonadal.

A bióloga Talita Sarah Mazzoni que me ajudou de forma imprescindível no estudo de desenvolvimento gonadal.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Simões Pião pelo grande auxílio nas análises estatísticas.

A todos os queridos amigos da graduação e pós-graduação da UNESP-RC.

A todos meus mestres da UNESP que souberam me incentivar e conduzir meus passos, em especial a Prof^a. Dr^a. Ana Maria Costa-Leonardo pela paciência e pelos ensinamentos transmitidos durante o estágio de docência.

A todos os funcionários da UNESP de Rio Claro, em especial Gerson, Mônica e Antônio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior – (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) pelo auxílio financeiro cedido para realização dos experimentos.

A todas as pessoas que não foram citadas aqui, mas não esquecidas, por fazerem parte de minha vida acadêmica.

E, em especial, a minha família e meu namorado Lucas que foram o tempo todo muito pacientes, compartilhando sempre de minhas preocupações.

A todos, meu muito obrigada!!!

*"Quando a última árvore tiver caído;
Quando o último rio tiver secado;
Quando o último peixe for pescado;
Vocês vão entender que dinheiro não se come."*

Greenpeace

RESUMO

O lambari *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (2000) vem ganhando a atenção de pesquisadores e produtores, devido a sua alta taxa de sobrevivência, rápido crescimento, fácil aceitação de alimento artificial, carne saborosa e grande procura como isca viva. As fêmeas apresentam taxas de crescimento mais elevadas do que os machos tornando sua criação mais vantajosa. O processo de diferenciação sexual pode ser controlado pela administração de hormônios sexuais, em peixes sexualmente indiferenciados, alterando o curso da diferenciação no sentido do sexo desejado. Neste trabalho, o desenvolvimento gonadal foi acompanhado nas primeiras 180 horas pós eclosão – hpe (7,5 dias pós eclosão - dpe) das larvas, na tentativa de se conhecer o momento da diferenciação sexual e/ou a melhor fase para aplicação de hormônio feminizante. Foram mantidas 1.000 larvas recém-eclodidas em tanques de incubadoras sob aeração constante e temperatura ambiente. Dez exemplares foram diariamente fixados em solução Karnovsky modificada, incluídos em historesina, e corados com HE. Os resultados revelaram que as 12 hpe, o cordão gonadal já está alocado permanecendo por todo o período estudado. Durante o período inicial de aproximadamente 206°C dias de vida da larva não observou-se, por meio de análise histológica, diferenciação sexual em *A. altiparanae*. Nesta fase foi possível observar, a abertura da boca que se deu às 19 hpe e a transição alimentar que ocorreu entre 43 e 60 hpe. Em um segundo estudo, a produção de lotes monossexos femininos do lambari foi avaliada, pelo método direto, utilizando o estrógeno, valerato de estradiol, na tentativa de provocar a feminização dos machos. Para isto, foram utilizadas 1.000 larvas de lambari que foram distribuídas em quatro tanques de incubadoras com temperatura média de $21.8 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Inicialmente, as larvas foram alimentadas por náuplios de *Artemia salina* e, 72 hpe, essa alimentação foi substituída por uma dieta contendo 35% de proteína bruta acrescida de diferentes quantidades de hormônio feminizante, reunidos em quatro tratamentos: T1=tratamento controle, sem adição de hormônio na ração; T2=20 mg de valerato de estradiol por quilo de ração; T3=40 mg/kg; T4=80 mg/kg. Após o período de tratamento hormonal de 30 dias, os animais foram mantidos nos tanques, sem administração de hormônio, aguardando seu crescimento e facilitando a observação das gônadas para verificação da eficiência dos tratamentos. Após 161 dias do início do experimento (cerca de 3.864 hpe), foi realizada a biometria de 50 peixes por tratamento, num total de quatro tratamentos, e analisadas as gônadas. Foram obtidas 44% de fêmeas no tratamento controle, enquanto que o tratamento utilizando 20 mg apresentou 70%, e os tratamentos com 40 e 80 mg de hormônio apresentaram um percentual de 76% de fêmeas, resultado este, que se comparado a outros estudos, apresentou-se eficaz, devido ao grande percentual de fêmeas obtidas.

Palavras-chave: lambari, desenvolvimento gonadal, feminização, reversão sexual, estrógeno.

ABSTRACT

The lambari *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski (2000) has been getting attention of researchers and producers, due to its high rate of survival, fast growth, easy acceptance of food artificial, tasty meat and high demand as live bait. Females have higher growth rates than males making its creation more advantageous. The process of sexual differentiation can be controlled by administration of sex hormones in fish sexually undifferentiated, altering the course of differentiation towards the desired sex. In this study, the gonadal development was observed in the first 180 hours post-hatching – hph (7,5 days post-hatching - dph) of the larvae, in attempt to know the time of sexual differentiation and/or the best stage for the application of female hormone. 1.000 larvae, which were newly-hatched in tanks of incubators under constant aeration and ambient temperature, were kept. Ten specimens were daily fixed in solution Karnovsky modified, included in historesin, and stained with HE. The results showed that 12 hph, the gonadal cord is already allocated by remaining throughout the study period. During the initial period of, approximately, 206°C-day life of the larva, it is not observed, by means of histological analysis, sexual differentiation in *A. altiparanae*. At this stage, it was possible to observe the opening of the mouth, which happened at 19 hph, and the food transition, which occurred between 43 and 60 hph. In a second study, the production of female monosex lots of lambari was evaluated by the direct method, using estrogen, estradiol valerate, in an attempt to cause the feminization of males. For this purpose, 1.000 lambari larvae, which had been distributed in four tanks of incubators, in an average temperature of $21.8 \pm 2^{\circ}\text{C}$, were used. Initially, the larvae were fed by nauplii of *Artemia salina* and, 72 hph, their food was replaced by a diet containing 35% crude protein plus different amounts of female hormone, meeting in four treatments: T1= control treatment without addition of hormone in the diet; T2=20 mg of valerate estradiol per kilogram of diet; T3=40 mg/kg; T4=80 mg/kg. After the hormonal treatment period of 30 days, the animals were maintained in tanks, without administration of hormone, awaiting their growth and facilitating the observation of the gonads to verify the efficiency of treatments. After 161 days from the beginning of the experiment (around 3.864 hph), biometry of 50 fish per treatment was performed, totalling four treatments, and gonads were analyzed. 44% of females were obtained in the control treatment, while the treatment using 20 mg showed 70%, and treatments with 40 and 80 mg of hormone had a percentage of 76% of females, coming up to a result, which compared to other studies, showed to be effective due to the large percentage of females obtained.

Keywords: lambari, gonadal development, feminization, sex reversal, estrogen.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUÇÃO	12
1. A Importância de Novas Tecnologias Aplicadas À Piscicultura	13
2. A espécie <i>Astyanax altiparanae</i>	15
II. OBJETIVOS	19
III. RESULTADOS	21
Capítulo 1 - Desenvolvimento Gonadal Inicial de <i>Astyanax altiparanae</i>	23
1. Introdução	24
2. Materiais e métodos	28
2.1 Propagação semi-artificial do lambari <i>A. altiparanae</i>	28
2.2 Alimentação das larvas	29
2.3 Coleta das amostras de larvas para análise	29
2.4 Análise dos resultados	30
3. Resultados	31
4. Discussão	41
Capítulo 2 - Avaliação da Efetividade do Hormônio Valerato de Estradiol na Produção de Lotes Monossexos Femininos de <i>Astyanax altiparanae</i>	47
1. Introdução	48
1.1 Técnicas de reversão de sexo em peixes	49
1.2 Aplicação de hormônio para reversão do sexo	51
1.3 O hormônio valerato de estradiol	52
1.4 Aplicabilidade da reversão de sexo em outras espécies de peixes	53
2. Materiais e métodos	54

2.1 Propagação semi-artificial do lambari <i>A. altiparanae</i>	54
2.2 Alimentação das larvas	55
2.3 Preparação da ração com o hormônio	56
2.4 Coleta das amostras de peixes para análise	56
2.5 Técnica de coloração pelo carmim acético	57
2.6 Análise dos resultados	57
3. Resultados	57
3.1 Quanto a proporção dos sexos	57
3.2 Quanto ao crescimento dos peixes	58
3.3 Quanto a identificação do sexo	59
3.4 Quanto a variação da temperatura	60
4. Discussão	67
 IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	 73
 V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 75

I. INTRODUÇÃO

1. A Importância de Novas Tecnologias Aplicadas À Piscicultura

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2009) a produção mundial de pescados em 2006 foi da ordem de 143,6 milhões de toneladas. Deste total, 92 milhões tiveram origem na captura e 51,7 milhões na aquicultura.

A produção mundial de capturas em 2006 apresentou uma diminuição de 2,2 milhões de toneladas com relação a 2005, enquanto que a aquicultura continua a crescer mais rapidamente do que qualquer outro setor de produção de alimentos de origem animal, e em ritmo mais elevado do que a população humana. De uma produção de menos de um milhão de toneladas anuais no início da década de 1950, a aquicultura atingiu uma produção de 51,7 milhões de toneladas em 2006, representando uma taxa de crescimento anual de quase 7%. Desta forma, espera-se que a aquicultura possa superar as pescarias como fonte de pescados para a alimentação (FAO, 2009).

Em 2006, os dez principais países produtores de pescados foram os mesmos que em 2004. O Brasil ocupando a décima colocação, com a produção de uma média de 251 mil toneladas anuais, representando 2,5% do total da produção mundial nos últimos anos (FAO, 2009).

A fauna de peixes de água doce do Brasil está entre as mais ricas e diversificadas do planeta, contendo aproximadamente 39 famílias, 517 gêneros válidos e mais de 2.500 espécies (BUCKUP et al., 2007). Além disso, o Brasil possui grande potencial hídrico e climático destacando-se como um dos países de maior potencial para a expansão da aquicultura. Contudo, a piscicultura ainda apresenta resultados modestos de desenvolvimento, devido aos processos de produção adotados e à falta de informações sobre as espécies nativas com potencial zootécnico e deficiência de dados científicos acerca de sua biologia, especialmente a reprodutiva (GODINHO, 2007).

Nos últimos anos vêm aumentando os estudos sobre determinação e diferenciação do sexo em peixes e segundo Devlin e Nagahama (2002), uma das razões para isto diz respeito à explosão da população humana nos últimos dois séculos. A alimentação a partir de sistemas aquáticos é um componente cada vez mais importante da alimentação humana, e, os peixes ósseos compreendem a maior parte da biomassa utilizada por ela.

Em 2006, mais de 110 milhões de toneladas (77%) da produção mundial de pescado se destinaram ao consumo humano direto. Praticamente toda a quantidade restantes, 33 milhões de toneladas, se destinaram a produtos não-alimentares, especificamente, para a preparação de farinha e óleo de peixe (FAO, 2009).

O restabelecimento do peixe oceânico como fonte de alimento tem sido priorizada na última década, obrigando a demanda de “proteínas aquáticas” a ser cumprida através de sistemas de produção aquícola. Torna-se imprescindível a compreensão da biologia reprodutiva das espécies capturadas no meio natural para permitir um manejo eficaz e a predição dos impactos em potencial. Da mesma forma, nos sistemas de aquicultura, entender e controlar a reprodução é fundamental para a propagação eficaz de organismos devido as taxas de crescimento diferenciadas dos sexos e a necessidade de uma maturação sincronizada e confiável. Como membros integrantes do mesmo ecossistema habitado pela espécie humana, os peixes também estão se tornando cada vez mais importantes como indicadores de saúde ambiental no planeta, no que diz respeito à restrição e degradação de habitat. Nos casos em que a capacidade reprodutiva de uma população de peixes parece estar comprometida, é necessário compreender a dinâmica natural da população e as características da história de vida das espécies envolvidas. Parte dessa compreensão envolve o conhecimento das estratégias e dos mecanismos envolvidos na reprodução e determinação sexual para facilitar a melhor investigação sobre pontos de impacto (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Para piscicultura, a qualidade e a quantidade dos juvenis disponíveis são pontos críticos, pois devem ter taxa de sobrevivência e capacidade de crescimento elevadas para que se obtenha sucesso. Os juvenis podem ser capturados no ambiente natural, mas a disponibilidade de muitas espécies varia amplamente. Além disso, a ocorrência também pode ser sazonal, como no caso de várias espécies comerciais sul-americanas, que migram para reprodução e apresentam seu período reprodutivo concentrado, principalmente, nos meses de outubro a fevereiro. Uma técnica amplamente utilizada é a criação de reprodutores em cativeiro com a finalidade de controlar a reprodução e a obtenção de larvas e juvenis. Na criação de larvas, os objetivos principais visam à maximização do número e do peso dos juvenis produzidos durante a larvicultura, assim como à diminuição da mortalidade (BOCK; PADOVANI, 2000).

Desta forma, o desenvolvimento de sistemas intensivos de criação de peixes na aquicultura brasileira vem sendo cada vez mais necessário para atender as exigências impostas pelo mercado consumidor, procurando melhorar tanto a quantidade quanto a qualidade do produto produzido e comercializado. Dentre as exigências, destaca-se o estudo de espécies nativas com potencial zootécnico que apresentam características relacionadas à qualidade da carne e sua capacidade de adaptação a sistemas de criação (NAVARRO et al., 2002).

O Brasil possui uma vasta diversidade de espécies potencialmente aptas para criação em cativeiro, dentre elas o lambari *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (2000), que vem ganhando a atenção de pesquisadores e produtores, devido a alta taxa de sobrevivência de larvas e juvenis, rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, fácil aceitação de alimento artificial, carne saborosa, alta procura como isca viva por parte de pescadores (IHERING; AZEVEDO, 1936; SALES; FIRETTI, 2003; CEMIG, 2000) e como forrageiro para vários predadores (NOMURA, 1975; ESTEVES, 1996).

2. A Espécie *Astyanax altiparanae*

A ictiofauna neotropical apresenta a maior diversidade e riqueza de peixes de água doce conhecida (LOWE-McCONNELL, 1999; NAKATANI et al., 2001), sendo que, atualmente, existem mais de 4.000 espécies descritas e há estimativas de que possa existir cerca de 2.000 espécies ainda desconhecidas (REIS et al., 2003).

A ordem Characiformes é o grupo dominante dentre os peixes de água doce da América do Sul, sendo a família Characidae a maior e a mais complexa desta ordem (REIS et al., 2003; BRITSKI et al., 1999; NELSON, 1984; FOWLER, 1948).

A posição taxonômica da família Characidae, segundo FINK e FINK (1981), é a seguinte:

CLASSE - Osteichthyes

SUBCLASSE - Actinopterygii

INFRACLASSE - Teleostei

SUPERORDEM - Osthariophysi

SÉRIE - Otophysi

SUBSÉRIE - Characiphysi

ORDEM - Characiformes

FAMÍLIA – Characidae

Segundo Nelson (2006), a ordem Characiformes é composta por 18 famílias, com cerca de 270 gêneros e aproximadamente 1.674 espécies descritas, sendo que destas, 208 espécies são africanas. Na região tropical, a América do Sul é o local de distribuição de todas as espécies de Characiformes. Algumas famílias estão distribuídas até o sul da América Central (Ctenoluciidae, Crenuchidae, Parodontidae, Gasteropelecidae, Curimatidae, Lebiasinidae e Anostomidae), mas somente representantes de Characidae estão distribuídos até o México e a região do Texas nos Estados Unidos (NELSON, 2006). Na família Characidae estão inseridos peixes de hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e que exploram uma grande variedade de habitats (BRITSKI et al., 1984).

Dentro da família Characidae encontra-se a subfamília Tetragonopterinae que é um grupo bastante diversificado, com muitos gêneros e espécies, podendo ser encontrado ao longo da América do Sul e da América Central. A maioria das espécies pertencentes a esta subfamília é onívora e com hábitos de forrageamento muito ativos (BRITSKI et al., 1984).

Os tetragonopteríneos mais frequentes nos riachos do sudeste do Brasil são espécies dos gêneros *Astyanax*, *Bryconamericus*, *Deuterodon*, *Hollandichthys*, *Moenkhausia*, *Piabina*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* (GODOY, 1975; BUCKUP, 1999).

A espécie *A. altiparanae* (Figura 1), distribui-se pela bacia do alto rio Tibagi (SHIBATTA et al., 2002) e bacia do alto rio Iguaçu (GRAÇA; PAVANELLI, 2002). Caracteriza-se por apresentar o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta. As nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amarelas. Na nadadeira caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior, e, acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Contudo, apesar das marcantes características, como esta espécie ocorre numa grande diversidade de microambientes, as populações desse grupo de peixes não são homogêneas quanto à morfologia (RAMSDORF, 2007).



Figura 1: Lambari *A. altiparanae* (http://www.pisciculturapaulista.com.br/especie_lambari.html)

O lambari, *A. altiparanae*, é um peixe de pequeno porte que pode atingir até 20 centímetros de comprimento e 60 gramas de peso, sendo muito comum em águas interiores brasileiras, habitando riachos, rios, brejos e lagoas. É uma espécie muito prolífera e de desova parcelada, podendo desovar quase o ano inteiro excluindo-se apenas o período de temperaturas baixas. Na região sudeste é conhecido popularmente como lambari, lambari-do-rabo-amarelo, tambió ou piaba (IHERING; AZEVEDO, 1936; ANDRADE et al., 1985; CEMIG, 2000; PORTO-FORESTI et al., 2001).

Do ponto de vista de adequação e otimização, a criação do lambari nas propriedades rurais constitui-se numa excelente alternativa para pequenos e médios produtores, que procuram módulos de diversificação de suas atividades nas propriedades. A produção de lambaris em criações poderia ter diferentes destinações, entre as quais a sua utilização no consumo direto, sua industrialização na forma de conservas, utilização como alimento natural ou forragem na criação de peixes carnívoros ou ainda ser comercializado como isca viva para a pesca esportiva, entre outras possibilidades (PAIVA, 1997).

A ocorrência do processo de reprodução parcelada constitui um fator de importância no cultivo do lambari, podendo viabilizar a obtenção de três a quatro desovas durante o ano e possibilitando um incremento substancial na produção. Contudo, um melhor controle no manejo da larvicultura também deveria ser desenvolvido, em decorrência do aparecimento de lotes de indivíduos em diferentes estágios de crescimento. Do mesmo modo, sabe-se que problemas como as altas densidades decorrentes da falta de controle na produção de juvenis podem levar ao crescimento diferenciado dos indivíduos. Há também a possibilidade da ocorrência

de desovas de indivíduos precoces nascidos no mesmo período, que também irão contribuir para o aparecimento de heterogeneidade no tamanho, além de possíveis diferenças de tamanho decorrentes de características fisiológicas manifestadas nesta espécie, diferenciando machos e fêmeas, o dimorfismo sexual (CASTILHO-ALMEIDA, 2007).

Durante o período reprodutivo de *A. altiparanae*, diferenças morfológicas nítidas podem ser evidenciadas entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas, além de serem maiores e possuírem o corpo mais arredondado, são frequentemente mais precoces no crescimento do que os machos (PORTO-FORESTI et al., 2005; SATO et al., 2006). Desta forma, a produção de lotes monossexos femininos de *A. altiparanae* apresenta-se mais vantajoso para criadores.

As técnicas de controle da sexualidade em peixes representam um grande potencial para aumentar a produtividade nas criações, pois permitem obter os benefícios associados ao sexo que apresenta as características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de interesse econômico (TABATA, 1995). Para a aplicação de técnicas efetivas de reversão do sexo em peixes, é de extrema importância o conhecimento do período de diferenciação sexual destes, visto que, em geral, o período mais sensível (e indicado para aplicação de hormônios esteróides) é o tempo imediatamente antes ou concomitante com a diferenciação histológica inicial da gônada primitiva (HUNTER; DONALDSON, 1983).

Segundo Castilho-Almeida (2007), a criação de *A. altiparanae* em condições de alta densidade com a aplicação de metodologias específicas como técnicas de melhoramento genético, manipulação cromossômica (obtenção de indivíduos estéreis) e de reversão de sexo, pode certamente resultar na melhoria da produção, bem como viabilizar a utilização desta espécie em projetos de conservação e controle ambiental. O interesse na utilização destas técnicas na criação de lambaris merece destaque pelo fato da espécie apresentar gerações curtas, prole numerosa e ser de fácil manejo em condições de laboratório e de campo.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Diante do exposto sobre a importância da ampliação do conhecimento a respeito da biologia reprodutiva de espécies nativas e, sobre sua criação e manejo, o objetivo do presente trabalho foi analisar o início do desenvolvimento gonadal de *A. altiparanae*, para se estabelecer o melhor momento para aplicação de hormônios para reversão de sexo. Este trabalho visou conhecer também, a efetividade do hormônio valerato de estradiol na produção de lotes monossexos femininos de *A. altiparanae* por meio da análise morfológica das gônadas, permitindo quantificar a proporção de machos e fêmeas, contribuindo para a consolidação de uma técnica de reversão sexual em lambaris.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho estão apresentados em dois capítulos que, posteriormente, serão modificados e sintetizados a fim de atender às exigências para publicação em revistas especializadas.

Capítulo 1 – “Desenvolvimento Gonadal Inicial de *Astyanax altiparanae*”.

Capítulo 2 – “Avaliação da Efetividade do Hormônio Valerato de Estradiol na Produção de Lotes Monossexos Femininos de *Astyanax altiparanae*”.

CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO GONADAL
INICIAL DE *Astyanax altiparanae*

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que a reprodução em peixes teleósteos é muito diversificada, sendo as espécies predominantemente dióicas, com ocorrência de hermafroditismo e ginogênese (NAGAHAMA, 1983). A maioria das espécies tem um ciclo reprodutivo iniciando o desenvolvimento gonadal em época anterior aquela da reprodução, e completando sua maturação gonadal no momento em que as condições ambientais tornam-se adequadas a fecundação e desenvolvimento da prole (VAZZOLER, 1996).

Segundo a classificação de Vazzoler (1996) quanto aos mecanismos de reprodução sexuada de teleósteos, os lambaris são seres gonocóricos ou bissexuados, em que os indivíduos são do sexo feminino ou do masculino e a reprodução ocorre por ovuliparidade, que é a eliminação dos gametas na água, com fecundação e desenvolvimento externos.

Nas espécies de teleósteos com fecundação externa, os testículos são órgãos predominantemente pares e alongados, situados no celoma, ventralmente aos rins e dorsalmente ao canal alimentar, sustentados por uma camada fina de peritônio, o mesórquio (SELMAN; WALLACE, 1989; LE GAC; LOIR, 1999). São individualizados em toda a sua extensão, unindo-se apenas na extremidade caudal para formar o ducto espermático que se abre na papila urogenital. A superfície externa das gônadas é lisa, sendo morfologicamente variável de acordo com o desenvolvimento gonadal (ALEXANDRINO et al., 1985).

Os ovários dos teleósteos são estruturas alongadas, globosas e aos pares que se situam na porção dorsal da cavidade abdominal, ventralmente ao sistema néfrico e à vesícula gasosa. Prolongam-se no sentido crânio caudal e fundem-se no terço posterior, formando uma estrutura tubular curta (oviduto) que se estende até a abertura urogenital, por onde os óvulos alcançam o meio externo (SANTOS, 1981).

Como em outros vertebrados, a ativação ovular e a fecundação em peixes são seguidas por repetidas divisões celulares mitóticas para produzir uma blástula composta de células com grande potencial de desenvolvimento (NILSSON; CLOUD, 1992). De modo geral, peixes possuem óvulos telolécitos, em que clivagens meroblásticas distribuem células em uma fina camada, formando blastodiscos acima de uma grande massa de vitelo. Com movimentos celulares subsequentes, o desenvolvimento avança para a fase de gástrula em que células interagem,

induzem, e diferenciam-se em camadas germinativas e células especializadas, seguindo os tipos de tecidos. A pressuposta região gonadal é então, denominada como crista germinal (BALINSKY, 1975), e é formada por um espessamento longitudinal da mesoderme que sobressai na cavidade celomática ventral para o desenvolvimento renal e do mesentério (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

A migração das células germinativas primordiais (PGCs) é motivada por quimioatração e por meio de movimentos amebóides ativos, estas células seguem o mesentério gonadal em direção a gônada em formação (GILBERT, 2006).

Sabe-se que na espécie de peixe *Danio rerio*, as PGCs seguem um gradiente da proteína Sdf1 que é secretada pela gônada em desenvolvimento. O receptor para essa proteína é a proteína CXCR4 da superfície das PGCs (DOITSIDOU et al., 2002; KNAUT et al., 2003). Este sistema de orientação quimiotática Sdf1/CXCR4 é conhecido por ser importante na migração de linfócitos e células progenitoras hematopoéticas. A perda de CXCR4 das PGCs ou Sdf1 das células somáticas resulta em migração aleatória de células germinativas primordiais de *D. rerio* (GILBERT, 2006).

A expressão do sexo em peixes depende de dois eventos: determinação e diferenciação sexual. A determinação sexual é dada pelo sexo genético (ou genotípico), enquanto que a diferenciação sexual é responsável pelo desenvolvimento das gônadas (sexo gonadal ou fenotípico). A interação desses dois eventos resulta nos fenótipos macho ou fêmea, que se distinguem seja morfológica, comportamental, ou funcionalmente (PIFERRER, 2001).

A distinção entre a determinação do sexo e a diferenciação sexual é frequentemente difícil, uma vez que são utilizados regularmente os critérios de diferenciação sexual (morfológicos, celulares e moleculares) para inferir relações de sexo que tenham sido determinadas em uma direção particular. A diferenciação sexual é definida como o processo do desenvolvimento gonadal após o sexo ter sido determinado. Este processo influencia, características tais como comportamento, ou características sexuais secundárias morfológicas ou bioquímicas. A diferenciação sexual também pode inferir quando o processo de determinação do sexo é instável ou pode ser invertida, como no caso de algumas espécies de peixes. Desta maneira, a determinação do sexo é o controle primário (fatores genéticos, ambientais e algumas variáveis) que influencia o curso da diferenciação sexual, enquanto a

diferenciação sexual compreende as realizações físicas desses eventos em termos de desenvolvimento testicular ou ovariano (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

De acordo com Yamamoto (1969) e Yamazaki (1983) o sexo fisiológico dos peixes é determinado na ontogênese pelo processo bioquímico realizado sob controle genético, e vai depender do tipo primário de gônada, isto é, do sexo gonadal. O sexo genotípico, então, é estabelecido no momento da fecundação do óvulo pelo espermatozóide, porém a diferenciação do sexo fenotípico só ocorre em etapas posteriores do desenvolvimento.

Desta forma, a diferenciação sexual envolve todos os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento, resultando na expressão do sexo genético no sexo fenotípico. Isto inclui os primeiros eventos que ocorrem desde a gônada primordial até a diferenciação completa em testículos ou ovários (TABATA, 1995).

Segundo Rutaisire (2008), a diferenciação sexual em *Labeo victorianus* é inicialmente seguida de um percurso ovogênico. Este é marcado pela divisão de gonócitos e a formação de uma estrutura similar ao ovário com ovócitos pré-vitelogênicos. A diferenciação sexual definitiva, dá-se pela contínua ovogênese ou por atresia dos ovócitos pré-vitelogênicos com concomitante formação de espermatogônias. Peixes são conhecidos por apresentar uma vasta gama de ontogênias sexuais, porém, só podem ser considerados hermafroditas se puderem produzir machos maduros e gametas femininos em algum momento de suas vidas. Em seu estudo, Rutaisire (2008) notou a presença de estrutura gonádica, de ambos os sexos na mesma gônada durante o desenvolvimento, mas ainda não eram as gônadas funcionais, pois ovogênese em machos predestinados não progrediram para além do estágio inicial de desenvolvimento ovocítico. Baseado nesta classificação e nos resultados obtidos em seu estudo, Rutaisire (2008) inferiu que, *L. victorianus*, é um gonocorista indiferenciado.

Segundo Yamazaki (1983), nas espécies gonocóricas, a reversão do sexo obtida de modo artificial é, provavelmente, permanente, pois a ação dos genes determinantes do sexo gonadal é restrita ao período da diferenciação, diferente das espécies hermafroditas, nas quais os genes ligados ao sexo podem se expressar em estágios mais avançados do desenvolvimento gonadal.

Bruslé e Bruslé (1978) estudando tainhas da espécie *Mugil auratus* encontraram gônadas indiferenciadas em peixes tendo entre 100-165 mm de

comprimento; a diferenciação ovariana inicia-se em cerca de 140 mm e em testículos a 200 mm.

Yemelyanova (1976) obteve em seus resultados que diferenciações anatômicas em carpas prateadas (*Hypophthalmichthys molitrix*) são completadas com a idade de 60-75 dias (55-67 mm) e precedem diferenciações citológicas.

A diferenciação sexual ocorre cerca de dois meses após a desova em algumas carpas comuns (*Cyprinus carpio*), entretanto, o processo não é completado para muitos peixes até chegar aos quatro meses de vida (DAVIES; TAKASHIMA, 1980). Já Pospisil e Smisek (1971), afirmaram que a diferenciação gonadal em *C. carpio* ocorre apenas em sete a 10 meses de vida e depende do tamanho do peixe, enquanto que Davies e Takashima (1980) relataram que o tempo da diferenciação sexual em *C. carpio* não depende do tamanho. Segundo Jensen e Shelton (1983), o crescimento pode ser afetado pela disponibilidade alimentar ou pela temperatura. Para a carpa prateada (*H. molitrix*), Yemelyanova (1976) observou que a diferenciação citológica ocorreu durante o primeiro ano de vida nas regiões quentes da Rússia, mas não foi manifestado até o terceiro ano em peixes de regiões frias.

Como os peixes são pecilotérmicos o seu desenvolvimento é estreitamente relacionado com a temperatura da água, portanto medidas de tempo são dadas em unidades térmicas acumuladas (UTA) em graus centígrados dias, isto é, a soma das temperaturas médias diárias da água (SIQUEIRA, 2008).

A importância deste dado pode ser exemplificada com o caso das trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), nos quais os primeiros sinais da diferenciação sexual das gônadas aparecem primeiro nas fêmeas, entre 18 a 28 dias após a eclosão, a uma temperatura média de incubação de 11,5°C (VAN DEN HURK; SLOF, 1981), ou seja, entre 207°C dias e 322°C dias (UTAs). Desta forma, por meio das UTAs, pode-se calcular em quantos dias ou à que temperatura essa espécie se diferencia sexualmente e assim facilitar a manipulação, caso seja necessária a repetição do experimento em outras condições de tempo e temperatura.

Com base nos dados citados acima, e a importância da ampliação do conhecimento a respeito da biologia reprodutiva de espécies nativas, este trabalho teve como objetivo analisar o desenvolvimento gonadal inicial do lambari *Astyanax altiparanae*. O conhecimento do período de diferenciação sexual é importante para que se conheça o momento mais apropriado para aplicação do hormônio de reversão de sexo. Estes resultados, aliados aos testes de efetividade do hormônio

valerato de estradiol, poderão contribuir para a consolidação de uma técnica de reversão sexual em lambaris.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Reprodução e Genética de Peixes do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), localizado no Município de Pirassununga, SP (21° 56' S e 47° 22' W) (Figura 1) e nos laboratórios de Histologia e Citogenética da UNESP - Instituto de Biociências – campus de Rio Claro, SP.

Foi desenvolvido um experimento de acompanhamento do período inicial do desenvolvimento das gônadas de *A. altiparanae*, relacionando com as unidades térmicas acumuladas (UTA) em graus centígrados/dia.

Inicialmente foram utilizadas 1.000 larvas de *A. altiparanae*, obtidas por meio de propagação semi-artificial no CEPTA. As larvas foram distribuídas em quatro tanques de incubadoras horizontais com capacidade de 35 litros de água cada, sendo mantidos 25 litros de água e 10 larvas/L com água proveniente de uma represa, que está localizada nas dependências do CEPTA/ICMBio de Pirassununga, e que abastece o laboratório de Reprodução e Genética de Peixes.

A água dos tanques foi mantida sob aeração constante com renovação de 10 vezes ao dia. As larvas foram criadas à temperatura ambiente num período aproximado de oito dias, e, diariamente, foram aferidos valores de: oxigênio dissolvido= 6 a 7 mg/L, pH= 5,5 a 6,5, e alcalinidade da água= 20 mg/L.

A temperatura média da água durante o experimento, obtida por meio de coletas diárias às 10:00h e às 17:00h, foi de 27,5°C e o tempo da realização do mesmo foi de 7,5 dias pós eclosão (dpe). Desta maneira, tem-se que, o período estudo foi de, aproximadamente, 206°C dias (valor em UTA).

2.1 Propagação Semi-Artificial do lambari *A. altiparanae*

Foram utilizados 120 exemplares adultos de *A. altiparanae*, sendo 30 fêmeas e 90 machos, capturados em viveiros do CEPTA. Cada exemplar recebeu uma dose de extrato bruto de hipófise de carpa de 3 mg por quilograma de peso vivo. O hormônio foi dissolvido em solução salina estéril a 0,9%, num volume de 1 ml por quilograma de peso vivo e, a injeção foi administrada intraperitonialmente, próxima à base da nadadeira ventral, com seringas graduadas de 1 ml (HARVEY; CAROLSFELD, 1993; WOYNAROVICH; HÓRVATH, 1983).

Após a aplicação do hormônio hipofisário, os reprodutores foram estocados em dois tanques de incubadoras horizontais com capacidade de 35 litros de água cada, sendo mantidos apenas 25 litros de água. Cada tanque de incubadora continha três caixas (40 X 40 X 25 cm) em que foram distribuídas cinco fêmeas e 15 machos para cada caixa.

A desova dos reprodutores ocorreu sem interferência humana, e, em seguida a eclosão, as larvas foram contadas e 1.000 foram selecionadas ao acaso e distribuídas em quatro tanques de incubadoras.

2.2 Alimentação das Larvas

As larvas foram alimentadas nas primeiras horas após a absorção do saco vitelínico com náuplios de *Artemia salina*, na densidade de 500 náuplios/larva/dia, divididos em três refeições ao dia (08:30, 14:30 e 17:30h). Após este período, de acordo com a aceitação dos indivíduos, estes receberam plâncton selvagem coletado de tanques do CEPTA/ICMBio, previamente preparado conforme método descrito por Senhorini (1995).

A captura do plâncton nos tanques do CEPTA foi por meio de uma rede de coleta de plâncton de 200 micras. O plâncton foi distribuído nas incubadoras de maneira que, em cada tanque de incubadora, pudesse ser encontrada, no mínimo, uma densidade de aproximadamente 100 organismos por litro de água. Para a verificação da densidade de plâncton por litro, foi pipetado da coluna d'água, por meio de uma pipeta de vidro de 5 mL, o volume da mesma por três vezes e foi tirada a média do número de plânctons encontrados em cada pipeta. Este procedimento foi repetido em cada um dos tanques, nos horários da alimentação, e caso a densidade estimada fosse inferior era administrado mais alimento.

2.3 Coleta das amostras de larvas para análise

Todas as coletas foram realizadas de maneira aleatória.

Nas primeiras 72 horas de vida pós eclosão (hpe) ou 3 dias pós eclosão (dpe) das larvas, foram coletados 10 exemplares duas vezes ao dia: às 10:00h e às 17:00h. Nas horas posteriores (cinco dias seguintes), foram coletadas 10 larvas apenas às 10:00h da manhã. Desta maneira, as coletas das larvas foram realizadas às 12, 19, 36, 43, 60, 67, 84, 108, 132, 156 e 180 hpe.

Os procedimentos e análises histológicas das gônadas foram realizados no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP – campus de Rio Claro, SP. Devido ao seu tamanho pequeno, as larvas foram fixadas inteiras em solução Karnovsky modificada (Glutaraldeído a 2,5% + Paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2) por 24 horas.

Posteriormente, as larvas foram processadas em historesina, com desidratação em série crescente de concentração de álcool, iniciando-se com 24 horas em álcool 70%, seguidas de quatro horas em álcool 95%. Após, foi realizada a infiltração em solução 1:1 de mistura de álcool 95% e resina de infiltração por cinco horas, seguida de infiltração em solução de resina de infiltração por 12 horas, finalizando com a inclusão em metacrilato glicol (JB-4 Embedding Kit Polysciences).

Secções de 4 µm foram obtidas em micrótomo, distendidas em água destilada e colocadas sobre lâminas de vidro. Após isto foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. Foram realizadas secções seriadas a fim de melhor compreensão da disposição e localização das gônadas.

As lâminas obtidas com o material em questão foram submetidas à coloração com hematoxilina e eosina (HE). O procedimento de coloração iniciou-se com a hidratação dos cortes em 1 minuto de banho em água destilada e coloração em hematoxilina de Harris por 10 minutos. As lâminas reagiram com água por 4 minutos e foram lavadas em água corrente. Foram então banhadas por 6 minutos em eosina e novamente lavadas em água corrente. Depois de coradas, as lâminas foram desidratadas em estufa e montadas com Bálsamo do Canadá.

2.4 Análise dos resultados

Ao final deste experimento o material foi fotodocumentado e analisado por microscopia de luz, utilizando microscópio Olympus BX51 e câmera Olympus DP71 do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UNESP - campus de Rio Claro, SP.

3- RESULTADOS

Os resultados revelam que as gônadas das larvas de *A. altiparanae* apresentam-se como estruturas pares, em forma de um cordão filiforme (Figuras 2 e 3) que se estende desde a porção inicial do intestino médio, acima do saco vitelínico, até a abertura anal, local de terminação dos ductos urinários e reprodutivos. Este cordão gonadal está localizado na região celomática, entre o rim e o mesoderma, acima do intestino e paralelo ao fígado. Às 12 hpe, os cordões gonadais já estão alocados (Figura 2), e esta localização inicial permanece a mesma durante os oito primeiros dias de vida da larva, ou seja, até 180 hpe o cordão não muda de posição.

O cordão gonadal é composto principalmente por células somáticas (Figuras 2 e 3) e algumas células germinativas primordiais, os gonócitos (Figuras 2, 4 e 5). Durante as fases estudadas não se observou células específicas de ovários ou testículos.

As células germinativas possuem núcleo ocupando uma parte considerável do seu volume. A cromatina nuclear apresenta-se completamente descondensada, e os núcleos apresentam um ou dois nucléolos. O citoplasma apresenta grânulos intensamente corados por HE, que agrupados formam a chamada “nuage” (na Figura 5D - inset).

Observou-se células pigmentares que se apresentavam como grânulos escuros, no tom de marrom (Figuras 3, 4A, 4B, 4E, 4F e 5B), dispersos ou agregados nos prolongamentos da região do mesentério gonadal.

Desta forma, das 12 hpe as 180 hpe foram observadas somente células somáticas, células germinativas primordiais e tecido conjuntivo formando um cordão gonadal, demonstrando que histologicamente não há características que diferenciem machos e fêmeas na fase inicial do período larval analisada no presente estudo.

Como as larvas eram de tamanho muito pequeno, foram processadas inteiras, e este fato possibilitou a observação do desenvolvimento inicial da larva como um todo (Figuras 6, 7 e 8).

Resumindo-se ao interesse deste trabalho, atentou-se a alguns fatos importantes em relação a transição alimentar das larvas. A abertura da boca das larvas se deu às 19 hpe (Figura 6B), porém a presença de alimento no tubo digestivo do peixe só foi observado às 60 hpe (Figuras 3 e 7A), juntamente com a absorção total do saco vitelínico (Figura 7A). O intestino apresentou-se como um tubo retilíneo às 12 hpe (Figura 6A), iniciando seu enovelamento a partir de 36 hpe (Figura 6C).

Nas últimas coletas, as larvas já se apresentavam bem desenvolvidas, com seus principais órgãos formados (Figura 8).



Figura 1: CEPTA/ICMBio – Pirassununga, SP.

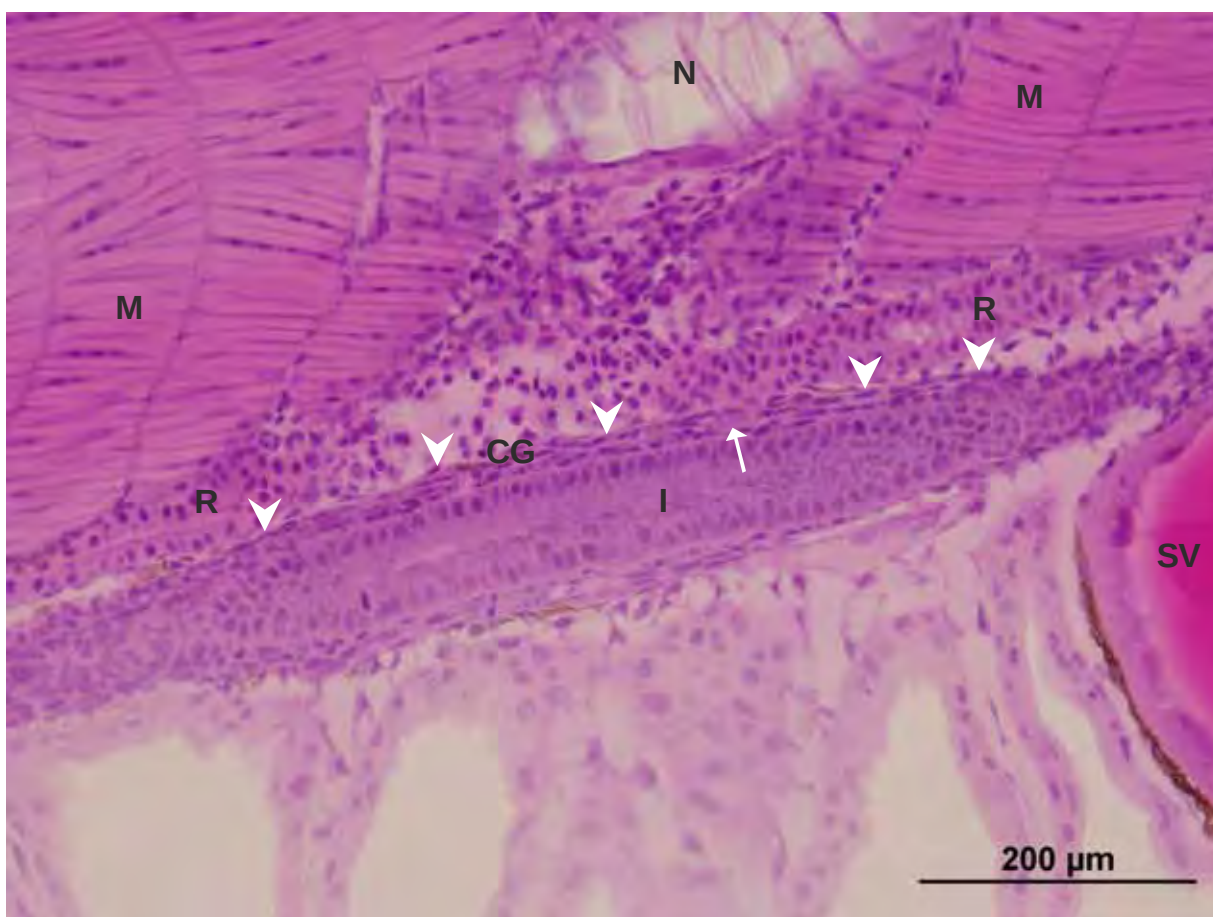


Figura 2: Secção longitudinal de larva de *A. altiparanae* com 12 hpe, coradas com HE. As cabeças de setas (▼) indicam as células somáticas e a seta comprida (→) indica um gonócito. N= notocorda, M= musculatura, R= rim, CG= cordão gonadal, SV= saco vitelínico e I= intestino.



Figura 3: Secção longitudinal de larva de *A. altiparanae* com 60 hpe, coradas com HE. As cabeças de setas (▼) indicam as células somáticas, a seta (→) indica a pigmentação do mesentério e o asterisco (*) indica o alimento presente dentro do lúmen intestinal. M= musculatura, R= rim, CG= cordão gonadal, BN= bexiga natatória, F= fígado, VS= vaso sanguíneo e I= intestino.

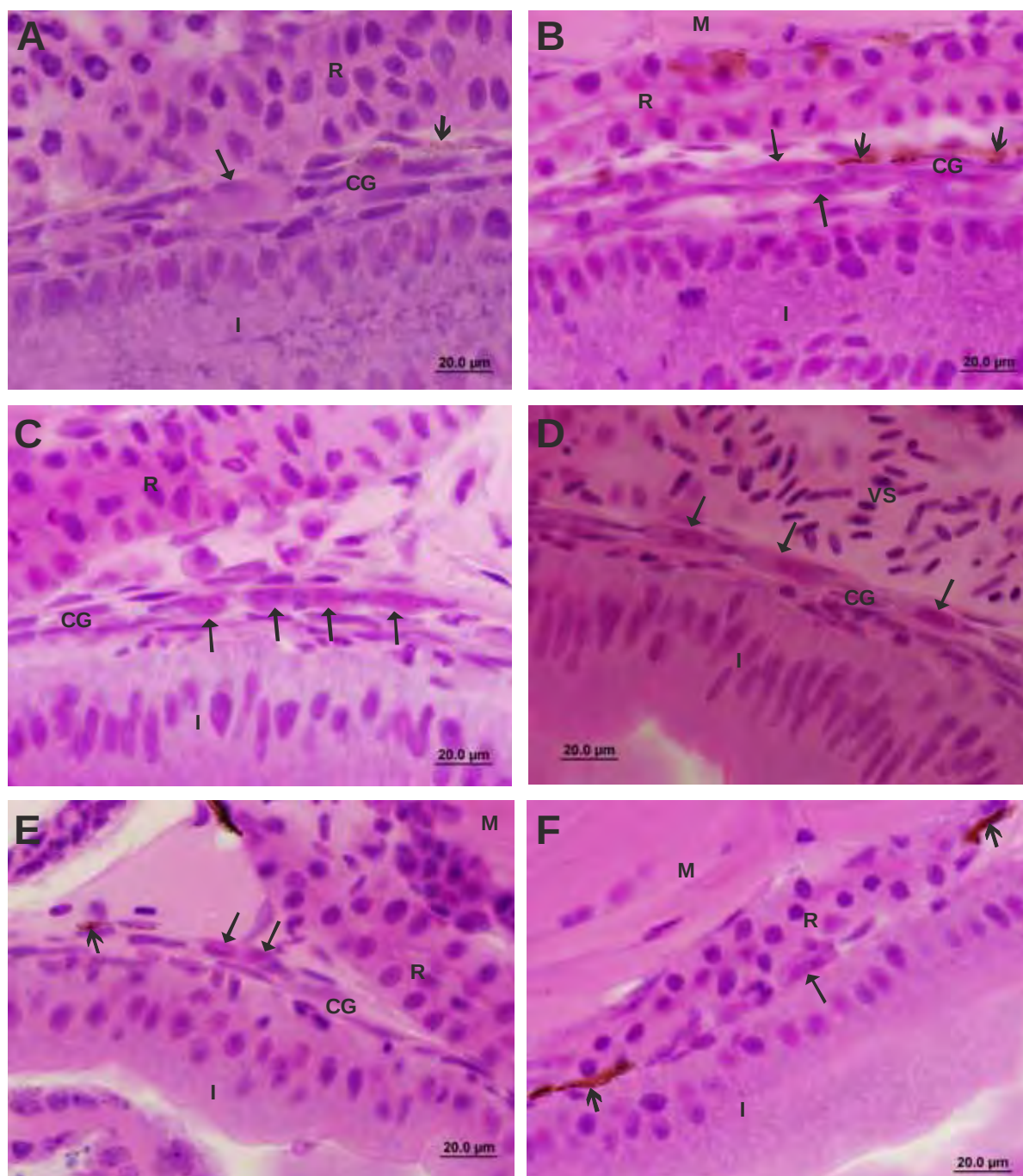


Figura 4: Secções longitudinais de gônadas de *A. altiparanae* coradas com HE, com 12 (A), 19 (B), 36 (C), 43 (D), 60 (E), 67 (F) hpe. As setas compridas (→) indicam os gonócitos e as outras setas (↗) indicam a pigmentação do mesentério. M= musculatura, R= rim, CG= cordão gonadal, I= intestino, VS= vaso sanguíneo.

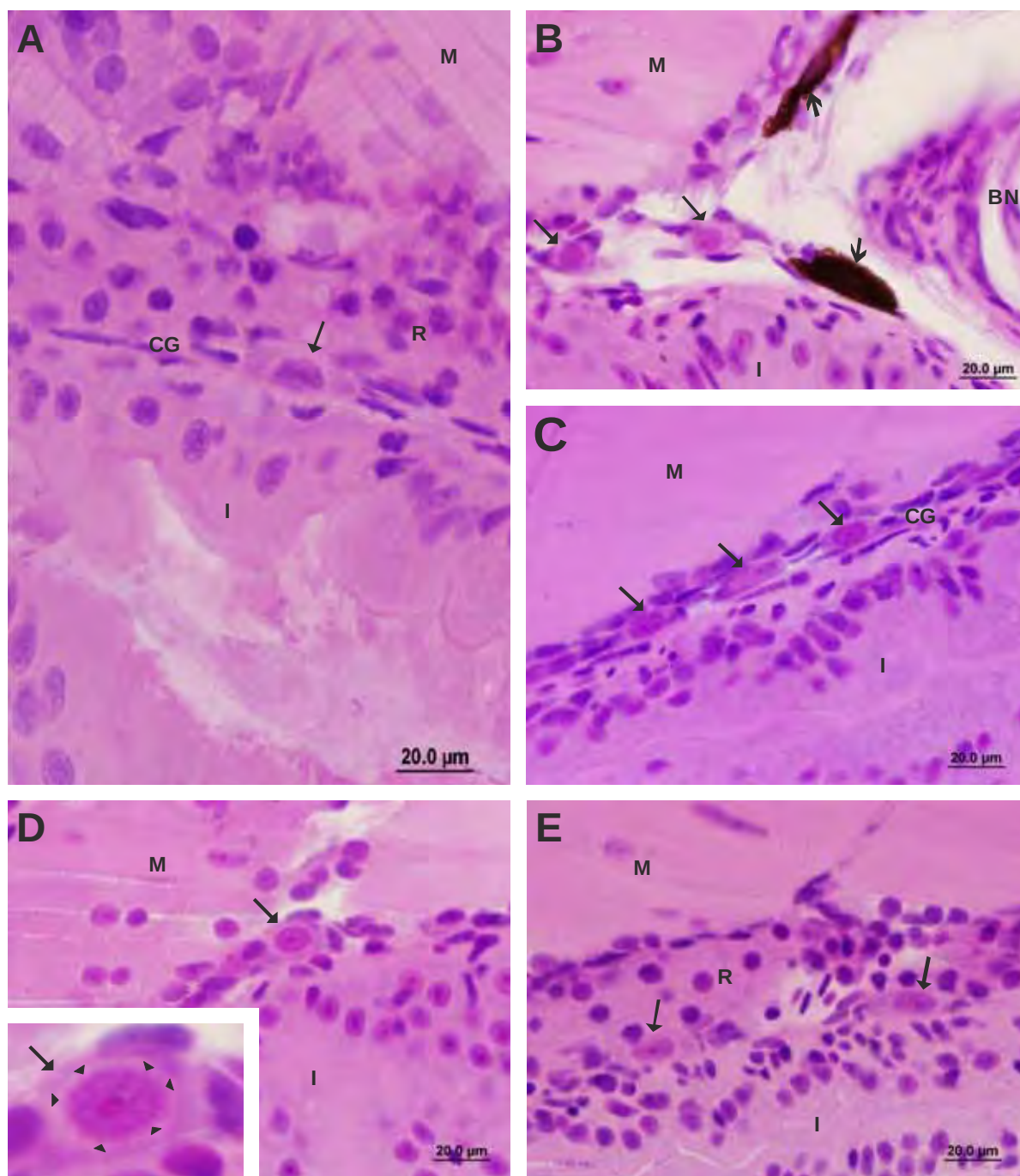


Figura 5: Secções longitudinais de gônadas de *A. altiparanae* coradas com HE, com 84 (A), 108 (B), 132 (C), 156 (D) e 180 (E) hpe. As setas compridas (→) indicam os gonócitos, as setas mais curtas (↗) indicam a pigmentação do mesentério, e as pequenas cabeças de seta (▶), no detalhe (D), indicam a nuage. M= musculatura, R= rim, CG= cordão gonadal, I= intestino e BN= bexiga natatória.

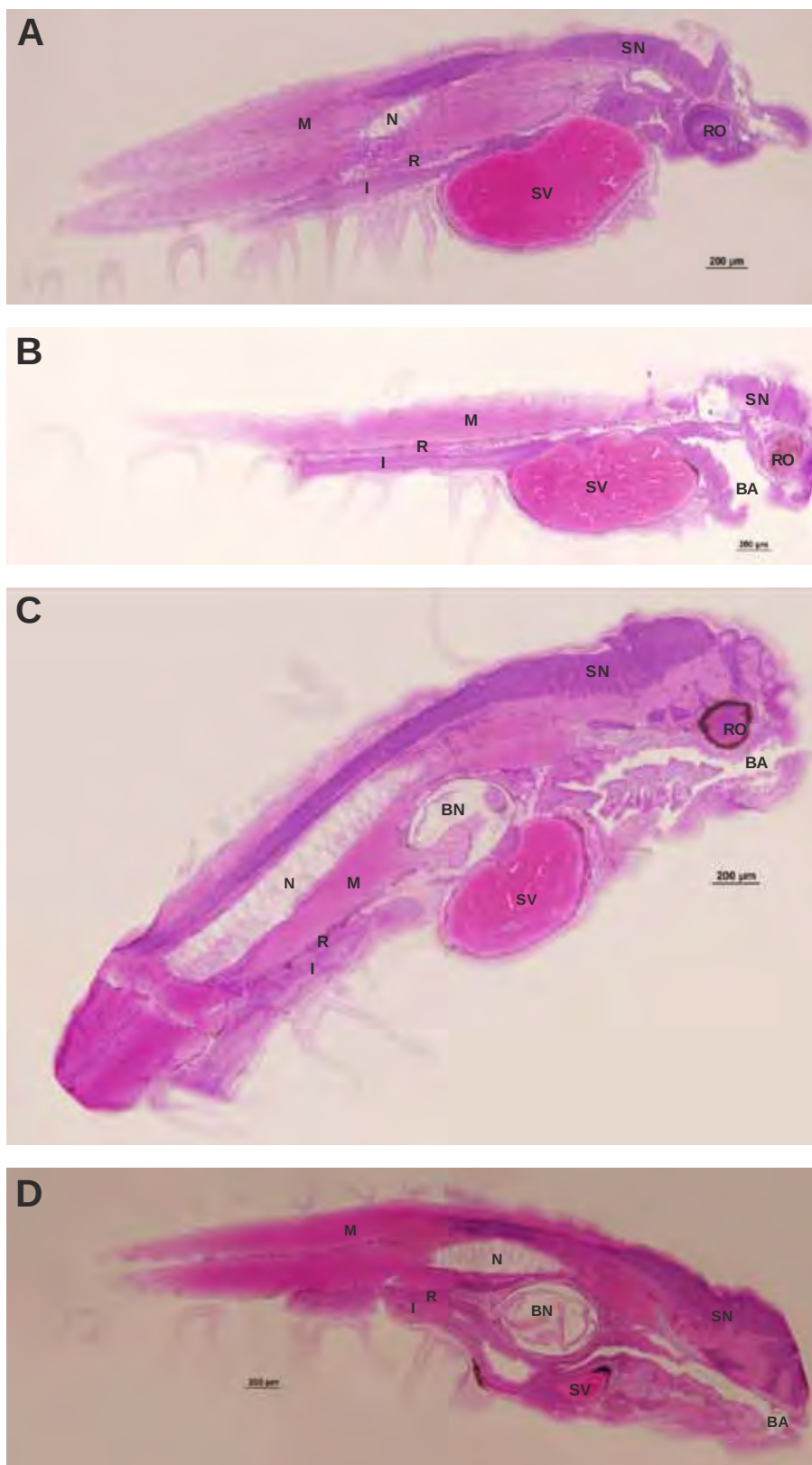


Figura 6: Secções longitudinais de larvas de *A. altiparanae* coradas com HE, com 12 (A), 19 (B), 36 (C) e 43 (D) hpe. Nota-se a abertura da boca com 19 hpe (B). I= intestino, R= rim, N= notocorda, BN= bexiga natatória, SV= saco vitelínico, M= musculatura, BA= boca aberta, SN= sistema nervoso e RO= região ocular.

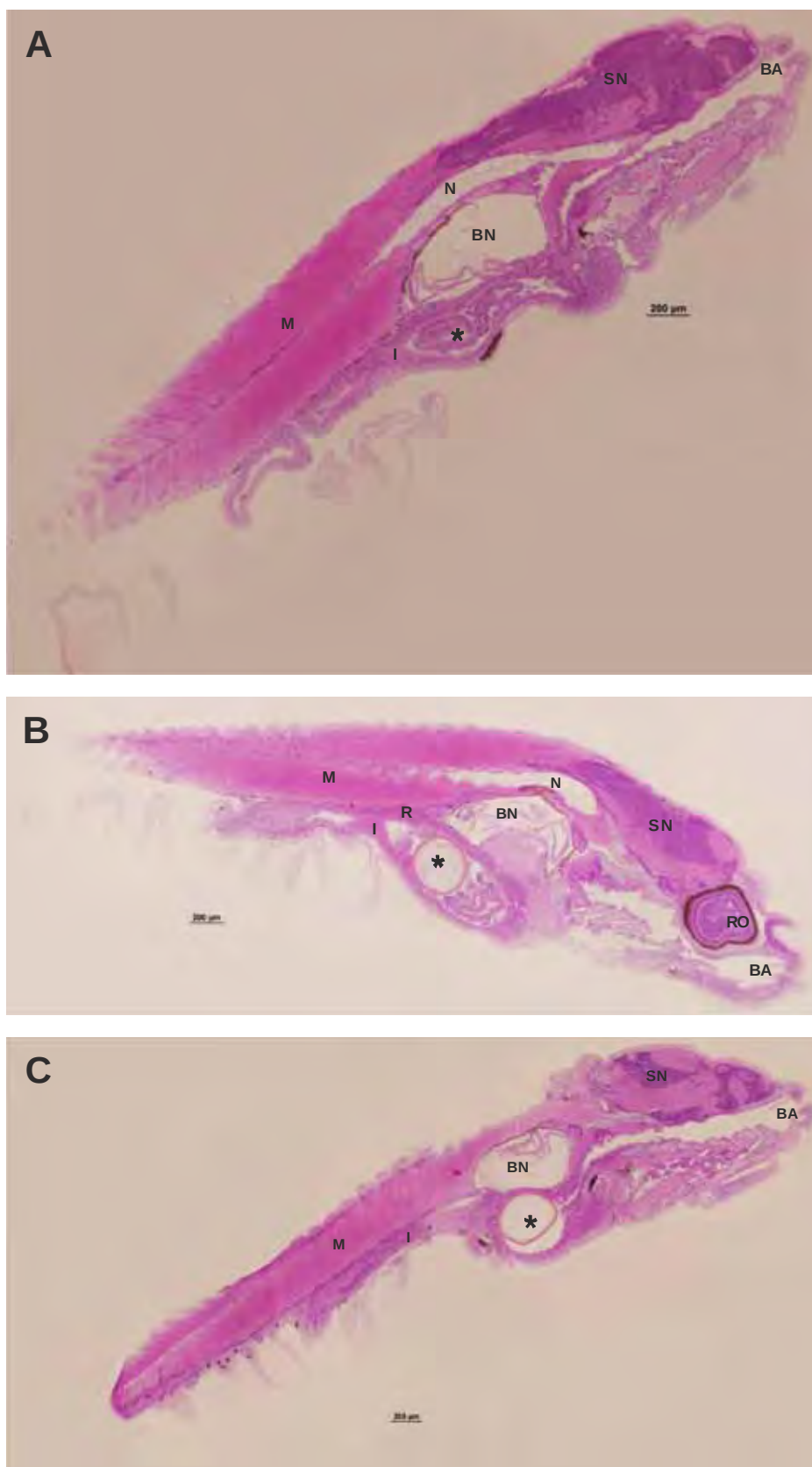


Figura 7: Secções longitudinais de larvas de *A. altiparanae* coradas com HE, com 60 (A), 67 (B) e 84 (C) hpe. Nota-se a absorção completa do saco vitelínico às 60 hpe (A) e a presença de alimento (*) no tubo digestório. I= intestino, R= rim, N= notocorda, BN= bexiga natatória, M= musculatura, BA= boca aberta, SN= sistema nervoso e RO= região ocular.

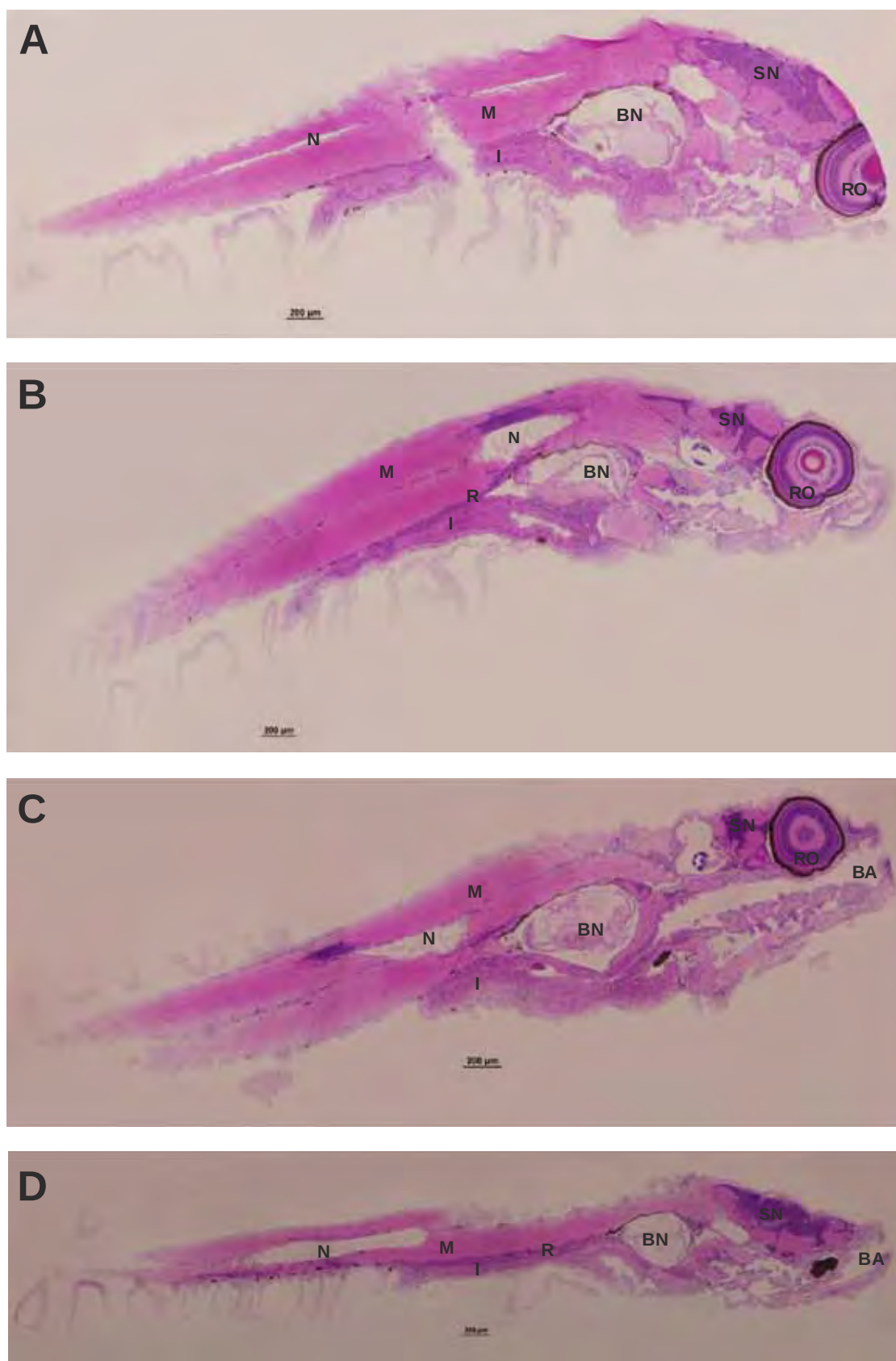


Figura 8: Secções longitudinais de larvas de *A. altiparanae* coradas com HE, com 108 (A), 132 (B), 156 (C) e 180 (D) hpe. I= intestino, R= rim, N= notocorda, BN= bexiga natatória, M= musculatura, BA= boca aberta, SN= sistema nervoso e RO= região ocular.

4- DISCUSSÃO

Dentro de ambos ovários e testículos dos teleósteos, uma clara distinção entre as células germinativas e somáticas pode ser feita, as primeiras têm potencial para divisões mitóticas e meióticas, enquanto as últimas diferenciam-se em estruturas associadas e tipos de células endócrinas. Como é o caso de muitos organismos vertebrados e não vertebrados, a origem do desenvolvimento destes dois tipos de células também difere em peixes (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

A distinção entre as células germinativas primordiais das células somáticas no presente estudo é observada logo no início da vida larval, as 12 hpe. Com células germinativas primordiais sendo gradualmente envoltas por células somáticas achatadas durante o crescimento do peixe, disposição esta, semelhante às descritas por Yamamoto e Onozato (1965), Combs (1969), Forberg (1982) e Alves e Godinho (1987).

A morfologia das células germinativas primordiais de *A. altiparanae* são semelhantes as já descritas para outros peixes teleósteos (SATO; EGAMI, 1972; VAN DEN HURK; SLOF, 1981; LEBRUN et al., 1982; ROBLIN; BRUSLÉ, 1983; ALVES; GODINHO, 1987).

A ocupação das gônadas por células germinativas primordiais se fez logo no início do desenvolvimento de *A. altiparanae*, com 12 hpe foi possível observar a presença destas células (PGCs) ocupando os cordões gonadais. Resultado este semelhante ao obtido por.

Já Bruslé e Bruslé (1978) estudando tainhas da espécie *Mugil auratus* obtiveram como resultados que a colonização de tecidos somáticos por PGCs em *M. auratus* é tardia, sendo que não encontraram células germinativas em gônadas de peixes com até oito meses de vida e 90 a 100 mm de comprimento.

Alves e Godinho (1987) estudando a diferenciação gonádica de *Schizodon Knerii* observaram que no início da prófase meiótica, o citoplasma dos ovócitos de *S. Knerii* construíram agregações de um denso material basofílico. De acordo com Toury et al. (1979) e Wallace e Selman (1981), esse material ("nuage") atinge o citoplasma através dos poros do envelope nuclear e é constituído por partículas ribonucleoproteicas.

A espécie *A. altiparanae* apresentou "nuage" que apresenta forma irregular e está presente como densas manchas ou "nuvens" em determinadas regiões do

citoplasma das células germinativas primordiais. A sua função ou destino permanece desconhecida, porém, há indicações de que no ovócito este material forme o germoplasma responsável pela linha germinal da próxima geração (CRUZ-LANDIM; CRUZ-HOFLING, 1979; EDDY, 1975). A “nuage” está sempre presente nas células germinativas primordiais de todos animais (EDDY, 1975) e apresenta-se bem desenvolvida em ovócitos de teleósteos (YAMAMOTO, 1964; DROLLER; ROTH, 1966; ANDERSON, 1968; BEAMS; KESSEL, 1973; BRUSLÉ, 1980; WALLACE; SELMAN, 1981; DE VLAMING, 1983; NAGAHAMA, 1983). Em *Piaractus mesopotamicus*, a “nuage” aparece nas espermatogônias, apresentando-se fixada a cavidade do envoltório nuclear ou dispersa no citoplasma, sempre associada com mitocôndrias, sendo que lhe foi atribuída, por Clérot (1979), função em replicação mitocondrial (CRUZ-LANDIM et al., 2003). Além das espécies *P. mesopotamicus* (ABDALLA; CRUZ-LANDIM, 2004) e *S. Knerii* (ALVES; GODINHO, 1987), a ocorrência de “nuage” foi descrita também em *Serrasalmus spilopleura* (GUIMARÃES; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2001), *Oryzias latipes* (HAMAGUCHI, 1987; 1993) e *Barbus conchoni* (GEVERS et al., 1992).

As células pigmentares presentes no mesentério gonadal de *A. altiparanae* possuem pigmento de natureza melânica e segundo Oliveira e Zieri (2005) a nomenclatura mais apropriada para essas células é melanócito.

O grau de diferenciação da larva recém-eclodida depende, entre outros fatores, da espécie e do tamanho do ovo (BLAXTER, 1969; WOYNAROVICH; HÓRVATH, 1983). A maioria das larvas de peixes de água doce eclode com boca e mandíbulas ainda não formadas, olhos despigmentados e saco vitelínico grande (NAKATANI et al., 2001). Poucas espécies, como o peixe-lobo, *Anarhichas lupus*, eclodem com características externas semelhantes aos juvenis, com os órgãos internos já diferenciados, apresentando poucas características larvais, como a presença do saco vitelínico (FALK-PETERSEN; HANSEN, 2001). No caso de *A. altiparanae*, as 12 hpe as larvas apresentam-se com boca e mandíbulas ainda não formadas, olhos pouco pigmentados e saco vitelínico grande.

A morfogênese e a diferenciação são processos rápidos e complexos durante a ontogenia inicial dos peixes. As larvas recém-eclodidas sofrem mudanças drásticas em sua forma de corpo, morfologia, metabolismo, habilidades natatórias e comportamentais, normalmente em curto período (MACIEL, 2006). Antes da abertura da boca, as larvas nutrem-se do vitelo, que é reabsorvido constantemente

através de endocitose via camada sincicial vitelínica (SHAHSAVARANI et al., 2002). A camada sincicial é uma camada citoplasmática contínua localizada entre o disco da blastoderme e o vitelo, resultando de uma divisão incompleta dos blastômeros (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007).

O tamanho do saco vitelínico e seu tempo de absorção também são espécies-específicos e quanto maior for a quantidade de reservas endógenas disponíveis, mais longo será o período que as larvas de peixes possuem para se adaptar a captura de alimentos externos, enquanto são sustentados pelas reservas do saco vitelínico (BLAXTER, 1969; WOYNAROVICH; HÓRVATH, 1983; BONILAWSKA et al., 2000; GISBERT et al., 2000). Para espécies reofílicas, que produzem ovos pequenos, com pouca reserva endógena e nenhum cuidado parental, o tempo de adaptação para enfrentar condições ambientais adversas é curto, sendo imprescindível que as larvas cheguem rapidamente a forma juvenil e adquiram características mínimas necessárias para sobreviver às duras condições ambientais e aos predadores (VANDERWALLE et al., 2005).

As maiores alterações do aparelho digestório de peixes acontecem durante o período larval, resultando em um aparelho funcional que pode, em algumas espécies, ser estruturado antes mesmo do vitelo ser totalmente consumido (MACIEL, 2006). Neste estudo foi observado que a espécie *A. altiparanae* apresenta tubo digestório em desenvolvimento e presença de saco vitelínico às 43 hpe; já às 60 hpe não há mais vestígios do saco vitelínico e pode ser notado alimento na luz do intestino. Desta forma, o período de transição alimentar ocorreu entre 43 hpe e 60 hpe, sendo que não foi observado, concomitantemente, um aparelho digestório funcional e presença de saco vitelínico, porém, há de se considerar a possibilidade de ocorrer um período de alimentação mista entre 43 hpe e 60 hpe.

O desenvolvimento das estruturas corporais das larvas de peixes, juntamente com o início da alimentação exógena, são eventos importantes que garantem sua sobrevivência (BALON, 1986).

A abertura da boca das larvas, no presente trabalho, ocorreu às 19 hpe. Já para a espécie *Salminus brasiliensis*, a uma temperatura entre 23 e 26°C, a abertura da boca e o início da ingestão começam de 25 a 28 hpe (ZANIBONI FILHO, 1997; SANTOS; GODINHO, 2002).

Reynalte-Tataje et al. (2004) notaram a abertura da boca de *Brycon orbignyanus* com 10,5 hpe; Pereira et al. (2006) observaram essa fase em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) às 24 hpe e Pérez et al. (2001) notaram a abertura da boca em *Pseudoplatystoma fasciatum* às 48 hpe.

A ausência de saco vitelínico em *A. altiparanae* foi observada com 2,5 dpe (60 hpe), resultado próximo ao obtido por Santos e Godinho (2002), que estudando larvas de *S. brasiliensis* cultivadas numa temperatura de 23 a 25°C, observaram que estas absorveram totalmente o saco vitelínico com 3 dpe.

O resultado de absorção total do vitelo em 2,5 dpe pode ser considerado como sendo um desenvolvimento larval rápido como o das demais espécies de teleósteos de água doce. Porém, Romagosa et al. (2001), observaram em larvas de matrinxã (*Brycon cephalus*), um desenvolvimento mais rápido, com absorção total do saco vitelínico em 1,5 dpe (36 hpe).

Nas larvas de curimatá-pioa (*Prochilodus costatus*), curimatá-pacu (*Prochilodus argenteus*) e duas espécies de surubins (*Pseudoplatystoma corruscans* e *P. fasciatum*), a absorção quase total ou total do vitelo foi registrada com 4 dpe (GODINHO et al., 2003; PÉREZ et al., 2001). Enquanto que nas larvas de piauí-verdadeiro (*Leporinus obtusidens*) o saco vitelínico permanece até 5 dpe (GODINHO et al., 2003).

O processo natural de diferenciação gonadal tem sido descrito de maneira diferente entre algumas espécies de teleósteos. Segundo Yamamoto (1969), em trutas arco-íris (*O. mykiss*), o período de diferenciação sexual corresponde ao final da absorção do saco vitelínico e início da alimentação (período da transição entre a alimentação endógena e exógena). Nesses estágios iniciais do desenvolvimento, a diferenciação sexual é bastante lábil e a reversão completa e funcional dos sexos pode ser facilmente obtida pela administração de hormônios esteroidais.

Apesar da diferenciação sexual ocorrer durante a transição alimentar para a espécie *O. mykiss*, esse período não corresponde ao da espécie *A. altiparanae*, em que a transição alimentar ocorreu entre 43 e 60 hpe, e nesta fase não foi observada a diferenciação sexual desta espécie, mesmo durante um período maior, de 180 hpe, está diferenciação não foi observada.

Em várias espécies de tilápias, a distinção de sexos é primeiramente reconhecível pela formação de uma cavidade ou ranhuras no tecido estromal (ECKSTEIN; SPIRA, 1965; NAKAMURA; TAKAHASHI, 1973; YOSHIKAWA; OGURI,

1978). Em medaka, *Oryzias latipes*, características morfológicas associadas com atividades das células germinativas marcam o início da diferenciação sexual gonadal (SATO; EGAMI, 1972; ONITAKE, 1972).

Em *Oreochromis niloticus* (NAKAMURA; NAGAHAMA, 1989; NAKAMURA et al., 1998), a diferenciação dos tecidos conjuntivos – ducto eferente e células de Leydig – tem sido relatado como o primeiro passo em direção a diferenciação testicular inicial (ANTONELI, 2006).

Estudos têm proposto que as células-tronco de Leydig, primeiro surgem no mesonefro, ou rins primitivos, e depois migram para o testículo para ocupar o tecido intersticial (WARTENBERG, 1978). Na verdade, durante o desenvolvimento e diferenciação sexual gonadal, células de Leydig estão restritas, ou são encontradas principalmente, perto dos vasos sanguíneos (NAKAMURA; NAGAHAMA, 1989; GRANDI; COLOMBO, 1997). De acordo com Antoneli (2006) as células de Leydig são especialmente encontradas próximas aos capilares sanguíneos, mas também são vistas perto de estruturas femininas, células germinativas masculinas imaturas, e espermatócitos ou lóbulos seminíferos em desenvolvimento.

Grandi e Colombo (1997), estudando as células germinativas primordiais, observaram em enguias européias, que as células de Sertoli se originam das células somáticas que envolvem as células germinativas primordiais, que são as mesmas que dão origem também às células foliculares, e ainda sugerem contribuição para a formação da lâmina basal, assim como observado por Flores e Burns (1993), que também consideram como a origem da célula de Sertoli as células que amparam as células germinativas, mostrando uma similaridade com as células de suporte das ovogônias. Esses autores ainda sugerem que a direção do desenvolvimento de tal célula germinativa pode, por sua vez, depender do destino da célula de suporte que a envolve e se esta vai desenvolver-se em célula folicular ou de Sertoli (MITSUIKI, 2002).

Apesar da existência de fatores que indiquem o início da diferenciação sexual em determinadas espécies de peixes, nenhum destes fatores foi observado para a espécie *A. altiparanae* durante os primeiros 206°C dias de vida. Ou seja, durante as 180 hpe estudadas, somente foram observadas células somáticas, células germinativas primordiais e tecido conjuntivo formando um cordão gonadal, demonstrando que histologicamente não há características que diferenciem machos e fêmeas nesta fase inicial de vida da larva.

Reinboth (1972), declarou que a distinção de espermatogônias, ovogônias primárias e ovócitos antes da prófase meiótica é algo arbitrário e frequentemente é baseado em recursos somáticos da gônada. Harrington (1974) enfatizou que o sexo gonadal é reconhecível primeiramente em tecidos não germinativos de algumas espécies de peixes.

A determinação morfológica precoce da diferenciação testicular, até mesmo na ontogênese dos peixes, é muito difícil porque as células germinativas estão em repouso por um tempo maior nos testículos do que nos ovários (NAKAMURA; NAGAHAMA, 1989; HENDRY et al., 2002; PARK et al., 2004; MEIJIDE et al., 2005).

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE
DO HORMÔNIO VALERATO DE ESTRADIOL NA
PRODUÇÃO DE LOTES MONOSSEXOS DE
Astyanax altiparanae

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de controle da sexualidade em peixes representam um grande potencial para aumentar a produtividade nas criações, pois permitem obter os benefícios associados ao sexo que apresenta as características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de interesse econômico (TABATA, 1995). Alguns grupos de peixes apresentam fêmeas com taxas de crescimento mais elevadas do que os machos, alcançando tamanhos maiores, como é o caso, por exemplo, de alguns salmonídeos, particularmente a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e também da maioria das espécies nativas aptas a criação em cativeiro, destacando-se muitos characiformes e siluriformes.

Nas criações comerciais, esta marcada superioridade na taxa de crescimento de um dos sexos em relação ao outro é uma das principais vantagens obtidas pela criação de monossexos. Além disso, dependendo da espécie, as técnicas de controle dos sexos podem ainda trazer outros benefícios, tais como: supressão da reprodução (evitando o problema de superpopulação), contenção de gastos energéticos com a atividade reprodutiva, uniformidade de tamanho na colheita, diminuição dos riscos de impacto ambiental decorrente do escape de peixes para os sistemas naturais e aumento da produtividade (BEARDMORE et al., 2001).

As técnicas de reversão de sexo podem também reduzir os efeitos da maturação sexual na aparência e na qualidade da carne em algumas espécies de peixes (BEARDMORE et al., 2001). Para os salmonídeos, por exemplo, a esterilidade seria desejável para evitar a degradação física e a susceptibilidade às doenças que estão relacionadas com a maturação sexual (TABATA, 1995).

De acordo com Piferrer (2001), a esterilização é alcançada quando são utilizadas doses mais elevadas e maior duração de tempo (normalmente meses) do que as exigidas para masculinização ou feminização de determinada espécie de peixe.

A maturação sexual é um dos processos biológicos que mais afetam a produtividade, pois durante este período, a energia para o crescimento somático é canalizada para a produção de gametas, resultando na diminuição do crescimento, da eficiência alimentar, da sobrevivência e da qualidade do pescado (BYE; LINCOLN, 1986). Além disso, após atingirem a maturação sexual, os machos de alguns grupos de peixes, desenvolvem determinadas características sexuais

secundárias que consistem, principalmente, na projeção da mandíbula em forma de gancho e no espessamento e escurecimento da pele, que são indesejáveis sob o ponto de vista comercial. Estas alterações associadas à queda da resistência e ao aumento do comportamento agressivo os predispõem a infecções por fungos e bactérias, que além de comprometerem a comercialização podem provocar a morte dos animais (BROWN; ROBERTS, 1982).

1.1 Técnicas de Reversão de Sexo em Peixes

São vários os estudos sobre diferentes métodos para a realização da reversão do sexo em peixes, destacando-se entre essas metodologias as que seguem abaixo:

- Reversão de Sexo pela Adição de Hormônios na Dieta

Segundo Tabata (1995), a produção de lotes femininos de peixes pela técnica hormonal pode ser obtida de duas formas:

A: DIRETA: através da administração de estrógenos provocando a feminização dos machos genotípicos.

B: INDIRETA: através da masculinização de fêmeas genotípicas com andrógenos e posterior fecundação de ovócitos normais com o sêmen de fêmeas masculinizadas.

A via indireta, embora mais demorada pelo fato de envolver duas gerações, possui um número reduzido de peixes submetidos ao tratamento hormonal e utilizados apenas como reprodutores. As fêmeas masculinizadas, embora apresentem fenótipo masculino, são geneticamente femininas, produzindo espermatozóides que carregam apenas o cromossomo sexual que determina o sexo feminino, que fecundando ovócitos de fêmeas normais irão produzir descendentes somente do sexo feminino sem contato prévio com hormônios.

São várias as espécies em que o acasalamento de fêmeas masculinizadas com fêmeas normais produz uma progênie totalmente feminina, entre elas pode-se citar a truta arco-íris, o salmão do Atlântico, a tilápia do Nilo, a medaka e o “goldfish” (PIFERRER, 2001).

A feminização direta pode ser aplicada em qualquer espécie, independentemente do sistema de determinação sexual, ou qual é o sexo homogamético ou heterogamético, enquanto que, a feminização indireta é indicada para aquelas espécies em que as fêmeas são homogaméticas com relação ao sistema de determinação sexual (PIFERRER, 2001).

Estes tratamentos são conduzidos nas fases iniciais do desenvolvimento, muitos meses antes da comercialização e os resíduos desses esteróides desaparecem em menos de um mês depois de finalizado o tratamento (PIFERRER, 2001), não havendo portanto, riscos de contaminação da carne por hormônios. Este fato já foi confirmado por vários autores, que afirmaram que os hormônios esteróides (estrógenos e andrógenos) pesquisados por eles são rapidamente metabolizados e excretados (JOHNSTONE et al., 1983; PILLAY, 1990; HENDRY et al., 2003; SPECKER; CHANDLEE, 2003).

- Reversão de Sexo por Banhos de Imersão

A técnica de banhos de imersão envolve exposições periódicas ou contínuas das larvas em solução contendo o agente alterador da diferenciação de sexo, sendo um método alternativo à suplementação dietética (PANDIAN; SHEELA, 1995).

De acordo com alguns autores, a técnica de imersão tem sido mais eficiente do que a administração oral em espécies de climas temperados (BAKER et al., 1988; BEARDMORE et al., 2001). Entretanto a técnica de imersão não é empregada comercialmente em razão da inexistência de protocolo efetivo para nível de intervenção, idade das larvas, densidade de estocagem e outros, precisando ainda ser otimizada antes de ser utilizada para produção comercial, pois os resultados são inconstantes e o gasto de hormônio é superior ao da técnica de adição à ração (BOMBARDELLI; HAYASHI, 2005; WASSERMANN; AFONSO, 2003).

Em salmonídeos já foi observado que, os banhos de imersão aplicados próximos à eclosão, são eficientes para veicular os esteróides, pois, essas espécies possuem grande volume de vitelo, que serve como reservatório para o hormônio, que é absorvido durante a fase de diferenciação sexual (PIFERRER, 2001).

- Reversão de Sexo pela Temperatura

A temperatura pode afetar a diferenciação sexual ao longo do desenvolvimento dos peixes. Um choque ambiental, tal como uma alta temperatura,

pode romper o processo de desenvolvimento normal durante a diferenciação sexual, causando a mudança de machos para fêmeas e/ou de fêmeas para machos. Ou também, temperaturas elevadas podem ter efeito sobre a estrutura e ação de hormônios durante a diferenciação sexual (HUNTER; DONALDSON, 1983). De acordo com D´Cotta et al. (2001) a temperatura influencia o mecanismo de ação da enzima aromatase, que catalisa a transformação de andrógenos em estrógenos.

Portanto, a temperatura pode ser utilizada como uma outra forma de reversão de sexo, e a grande vantagem da utilização deste método para manipulação do sexo nos peixes utilizados no consumo alimentar é a não utilização de hormônios. Porém, é possível que a resposta na diferenciação sexual, através de variações na temperatura, varie entre linhagens diferentes dentro da mesma espécie, podendo não ser eficiente para todas as espécies (PATIÑO, 1997).

Para que se obtenha sucesso na alteração da proporção sexual pela manipulação da temperatura, o tratamento deve ser aplicado antes do início da diferenciação sexual das gônadas, as quais parecem apresentar sensibilidade à alteração de temperatura no mesmo momento em que apresentam sensibilidade aos tratamentos hormonais (BAROILLER; D´COTTA, 2001).

- Reversão de Sexo pelo PH

Pouco se encontra na literatura sobre reversão sexual pelo pH, sendo que Romer e Beisenherz (1996) observaram que a proporção de machos é mais alta em pH ácido (4,5) do que em valores mais neutros (6,5) nas espécies de *Apistogramma* e em *Poecilia melanogaster*.

1.2 Aplicação de Hormônio para Reversão do Sexo

O controle artificial do sexo em peixes, pela administração hormonal, iniciou-se com trabalhos realizados no final de 1930 e princípio de 1940 (YAMAMOTO, 1969). Os resultados obtidos nesses trabalhos proporcionaram não somente informações sobre os mecanismos genéticos da diferenciação sexual, mas também demonstraram as potencialidades de suas aplicações em espécies economicamente importantes, nos quais os cultivos monossexos são vantajosos (TABATA, 1995).

Uma vez que os esteróides sexuais estão envolvidos no processo natural de diferenciação sexual, esse processo pode ser controlado pela administração de hormônios sexuais, em peixes sexualmente indiferenciados, alterando o curso da diferenciação no sentido do sexo desejado (TABATA, 1995). Porém, a administração de hormônios deve ser feita com cautela, pois concentrações baixas podem não surtir efeito enquanto que doses excessivas podem causar efeitos negativos (MYLONAS et al., 1994).

À exemplo desses efeitos negativos, tratamentos com doses excessivas de estrógenos ou andrógenos podem levar ao não desenvolvimento gonadal ou à esterilidade. Estes efeitos podem refletir incompatibilidades entre o esteróide exógeno e processos genéticos e fisiológicos internos, ou efeitos patológicos no desenvolvimento gonadal. Além disso, tratamentos com doses excessivas de andrógenos podem também levar a uma redução na masculinização e, em alguns casos, induzir feminização paradoxal (PIFERRER et al., 1993).

Os resultados citados acima foram observados por Hackman e Reinboth (1974), que constataram o efeito feminizante em tratamentos com altas doses de 17- α -metiltestosterona e afirmaram que este hormônio exógeno, em excesso, é metabolizado para estrógeno, provocando feminização de indivíduos geneticamente machos, sugerindo assim uma diminuição nas doses administradas, ou até mesmo no tempo de alimentação com as dietas contendo este hormônio.

O início do tratamento e a sua duração são de importância crítica para a indução da reversão sexual em peixes. Em geral, o período mais sensível é o tempo imediatamente antes ou concomitante com a diferenciação histológica inicial da gônada primitiva (HUNTER; DONALDSON, 1983).

As evidências da existência de um período de maior sensibilidade aos tratamentos hormonais com estrógenos e andrógenos, foram constatadas em diferentes espécies como *Oncorhynchus kisutch* (PIFERRER; DONALDSON, 1989), *O. mykiss* (KRISFALUSI; NAGLER, 2000), *Oryzias latipes* (KOGER et al., 2000) e *Oreochromis niloticus* (APPLE; LEBOUTE, 1995).

1.3 O Hormônio Valerato de Estradiol

O estradiol (17 β -estradiol) é um hormônio sexual feminizante que pode ser encontrado sob diversas formas: valerato de estradiol, benzoato de estradiol, etinilestradiol.

O etinilestradiol, forma sintética mais potente do hormônio, é o estradiol alquilado semi-sintético com uma substituição 17-alfa-etinil (PDAMED, 2009). Já o benzoato de estradiol é uma forma esterificada do estradiol na posição C₃OH (VYNCKIER, 1990) e o valerato de estradiol é um éster do 17 β -estradiol, modificado na posição 17, particularidade que lhe confere uma meia-vida mais longa quando comparado ao benzoato de estradiol (WILLIAMS; STANCEL, 1996).

1.4 Aplicabilidade da Reversão de Sexo em Outras Espécies de Peixes

A grande maioria das espécies fluviais brasileiras, entre outros condicionantes para a reprodução, necessita de longas migrações rumo às nascentes dos rios. A dificuldade que se apresenta à criação destas espécies é a de produção de juvenis, uma vez que não se reproduzem naturalmente em tanques ou viveiros; por esta razão, torna-se necessário proceder a reprodução induzida com a incubação dos ovos e a criação de larvas em laboratório (BOCK; PADOVANI, 2000).

Para uma melhor produtividade na criação dessas espécies, é interessante a aplicação da técnica de reversão sexual, pois em contrapartida à dificuldade de criação da espécie em cativeiro, tem-se a produção de lotes com indivíduos do sexo de interesse comercial.

Desta maneira, o presente estudo sobre reversão sexual em *A. altiparanae* poderá ampliar a oportunidade da aplicação da técnica de reversão de sexo em outras espécies nativas de interesse econômico. Dentre essas espécies, destaca-se um grande número de espécies que apresentam fêmeas com taxas de crescimento superiores aos machos, atingindo tamanhos maiores, como por exemplo a cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), o pintado (*P. corruscans*), o mandi (*Pimelodus maculatus*), a matrinxã (*Brycon amazonicus*), a piraputanga (*B. insignis*), a piracanjuba (*B. orbignyanus*), o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a pirapitinga (*P. braquipomum*), o curimbatá (*Prochilodus lineatus*), a tabarana (*S. hilarii*) e o dourado (*Salminus brasiliensis*). A exemplo desta última, *S. brasiliensis*, é uma espécie de grande porte, que realiza

longas migrações reprodutivas e cujos machos podem atingir até cinco quilos de peso, enquanto as fêmeas atingem até 26 kg na natureza (MORAIS FILHO; SCHUBART, 1955).

Estes fatores enaltecem a necessidade de novos estudos que ampliem os conhecimentos da biologia reprodutiva dos peixes nativos, visando melhorias na conservação das espécies e aumento da produtividade na aquicultura brasileira.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Reprodução e Genética de Peixes do CEPTA/ICMBio – Pirassununga, SP e nos laboratórios de Histologia e Citogenética da UNESP - Instituto de Biociências – campus de Rio Claro, SP. Foi desenvolvido um experimento de reversão sexual de lambaris (*A. altiparanae*), realizando um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos da seguinte forma: (T1) tratamento controle – sem adição de hormônio na ração; (T2) ração com 20 mg de valerato de estradiol por quilo de ração; (T3) ração com 40 mg/kg e (T4) ração com 80 mg/kg.

Foram utilizadas 1.000 larvas de lambaris obtidas através de propagação semi-artificial no CEPTA. No início do experimento, as larvas com 48 horas pós eclosão (hpe), foram contadas e distribuídas em quatro tanques de incubadoras horizontais, com capacidade de 35 litros de água cada, sendo mantidos 25 litros de água e 10 larvas/litro. A água dos tanques foi mantida sob aeração constante com renovação de 10 vezes ao dia, com água proveniente de uma represa, localizada nas dependências do CEPTA/ICMBio de Pirassununga que abastece o pavilhão do laboratório de reprodução. Diariamente foram aferidos os valores de oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e temperatura da água.

2.1 Propagação Semi-Artificial do lambari *A. altiparanae*

Foram utilizados 120 exemplares adultos de *A. altiparanae*, sendo 30 fêmeas e 90 machos, capturados em viveiros do CEPTA. Cada exemplar recebeu uma dose

de extrato bruto de hipófise de carpa de 3 mg por quilograma de peso vivo. O hormônio foi dissolvido em solução salina estéril a 0,9%, num volume de 1 ml por quilograma de peso vivo e, a injeção foi administrada intraperitonicamente, próxima à base da nadadeira ventral, com seringas graduadas de 1 ml (HARVEY; CAROLSFELD, 1993; WOYNAROVICH; HÓRVATH, 1983).

Após a aplicação do hormônio hipofisário, os reprodutores foram estocados em dois tanques de incubadoras horizontais com capacidade de 35 litros de água cada, sendo mantidos apenas 25 litros de água. Cada tanque de incubadora continha três caixas (40 X 40 X 25 cm) em que foram distribuídas cinco fêmeas e 15 machos para cada caixa.

A desova dos reprodutores foi realizada sem interferência humana, e, cerca de 48 horas pós eclosão (hpe), as larvas foram contadas e 1.000 foram selecionadas ao acaso e distribuídas em quatro tanques de incubadoras.

2.2 Alimentação das Larvas

Nas primeiras 72 hpe ou três dias pós eclosão (dpe) as larvas foram alimentadas com náuplios de *Artemia salina* na densidade de 500 náuplios/larva/dia, divididos em três refeições (08:30, 14:30 e 17:30h).

Após este período, as larvas dos lambaris receberam uma dieta artificial com 35% de proteína bruta, contendo as quantidades de hormônio feminizante respectivo a cada tratamento, com exceção da dieta controle, fornecidas “*ad libitum*”, seis vezes ao dia. A ração não foi aplicada em um período anterior a este pois as larvas não estavam suficientemente desenvolvidas para a ingestão deste tipo de alimento.

Depois de 30 dias recebendo os tratamentos hormonais ou tratamento controle, os juvenis já estavam com 792 hpe (33 dpe). O experimento se estendeu para aguardar o crescimento dos juvenis, até as 3.864 hpe (161 dpe), possibilitando a retirada das gônadas para verificação da eficiência do tratamento hormonal. Nesta fase os peixes receberam a dieta controle “*ad libitum*”, sendo que a dieta controle consistia em ração balanceada com 30% de proteína bruta.

2.3 Preparação da ração com o hormônio

O hormônio valerato de estradiol em quantidades de 20 mg, 40 mg ou 80 mg, foi dissolvido em 500 mL de álcool etílico e misturados em um quilo de ração em pó. Após seca, a ração foi dividida em porções, embalada em sacos plásticos e mantida em congelador, retirando-se porções para consumo imediato.

2.4 Coleta das amostras de peixes para análise

Peixes com 96, 720 e 3.864 hpe (4, 30 e 161 dpe) foram coletados para biometria inicial, intermediária e final, respectivamente.

Após o crescimento dos juvenis, apresentando 3.864 hpe (161 dpe), 50 peixes de cada um dos quatro tratamentos, num total de 200 indivíduos, foram sacrificados através de choque térmico e necropsiados através de incisão na região ventral, a partir do ânus até o opérculo, para exposição dos órgãos e identificação do sexo dos indivíduos.

Para determinar o sexo dos lambaris foram analisadas a presença de características sexuais secundárias (fêmeas com ventre abaulado e maior irrigação por vasos sanguíneos nesta região do corpo, e machos com a nadadeira anal áspera ao toque) e avaliados alguns parâmetros das gônadas, como cor, transparência, vascularização e visualização de ovócitos a olho nu. Além disso, o sexo dos lambaris submetidos à reversão foi determinado e/ou constatado em todos os indivíduos, pelo método do carmim acético de Guerrero e Shelton (1974), e validada para juvenis de tilápia do Nilo por Wassermann e Afonso (2002). Para este exame microscópico das gônadas foi utilizado microscópio de luz modelo Nova 107.

Após a biometria final (3.864 hpe ou 161 dpe), as gônadas de um casal de exemplares de *A. altiparanae* de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente, dissecados e suas gônadas foram coradas com carmim acético. Preparadas as lâminas com o material, este foi fotodocumentado em microscópio de luz (Olympus BX51 e câmera Olympus DP71 do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UNESP) para simples ilustração das diferenças do sexo gonadal entre fêmeas e machos.

2.5 Técnica de coloração pelo Carmim Acético

Inicialmente, 0,5 g de índigo carmim foi adicionada a 100 mL de ácido acético (45%) e fervida por 5 minutos. Após o resfriamento, a solução foi filtrada utilizando papel filtro, e transferida para um frasco escuro. A solução de carmim acético foi gotejada sobre o tecido gonadal colocado sobre uma lâmina e coberto com uma lamínula, e então esmagado sob leve pressão. Em seguida, o material foi levado ao microscópio e observado.

2.6 Análise dos resultados

Foi realizado um delineamento experimental em que, as variáveis peso, comprimento e proporção de macho e fêmea, foram elaboradas em tabelas e analisadas estatisticamente, de acordo com Sokal e Rohlf (1995). Os procedimentos da análise da variância fatorial e teste de Tukey foram analisados utilizando o programa estatístico SAS, versão 9.1 (SAS, 1996). Estas análises estatísticas foram realizadas no Departamento de Estatística, Matemática Aplicada e Computação do Instituto de Geociências e Ciências Exatas de Rio Claro, UNESP, sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Carlos Simões Pião.

3. RESULTADOS

3.1 Quanto a Proporção dos Sexos

Observou-se uma diferença significativa na proporção de machos e fêmeas nos diferentes tratamentos, sendo que o tratamento 1 (controle) apresentou 44% de fêmeas, enquanto o tratamento 2 (20mg/kg) apresentou 70% de fêmeas e os tratamentos 3 e 4, que receberam dosagens de 40 mg e 80 mg, respectivamente, do hormônio valerato de estradiol por quilo de ração apresentaram uma porcentagem de 76% de fêmeas (Tabela 1).

Por meio do teste de comparação binominal, entre duas amostras independentes, foi possível comparar a proporção de fêmeas entre os quatro tratamentos. A proporção de fêmeas nos tratamentos 2, 3 e 4 foram significativas quando comparadas ao tratamento controle. Entre os tratamentos 2, 3 e 4 não houve diferenças significativas (Tabela 1).

3.2 Quanto ao Crescimento dos Peixes

A fim de se conhecer se houve alteração no tamanho e peso dos animais durante a realização do experimento, foram feitas biometrias em todos os tratamentos, sendo que às 96 e 720 hpe (4 e 30 dpe) foram coletadas 100 larvas para realização da biometria inicial e intermediária, respectivamente.

Tanto o peso individual quanto o peso de todas as larvas juntas, com 96 hpe, não foram mensurados por serem muito pequenos, e, o comprimento médio das larvas neste estágio foi de aproximadamente 4,3 mm ($dp = 0,003$).

Na biometria intermediária (Tabela 2), as larvas já estavam recebendo ração com diferentes dosagens de hormônio e nesta fase do experimento foram detectadas diferenças significativas de médias de comprimento e peso obtidas entre os quatro tratamentos.

Para verificar a variável peso, em relação aos diferentes tratamentos, da biometria intermediária, utilizou-se o modelo do tipo fatorial, considerando como fator o tratamento (T1; T2; T3; T4). Observou-se evidência ao nível de 5% de significância que houve diferença entre os tratamentos para a variável peso (Tabela 2).

Aplicando o teste de Tukey para a variável peso, observou-se diferença significativa em relação aos tratamentos, sendo que o tratamento controle apresentou valor maior, seguido pelos tratamentos 3 e 4, e por último observou-se o tratamento 2, com a menor média (Tabela 2).

Para verificar o comportamento do comprimento em relação aos diferentes tratamentos, utilizou-se o modelo do tipo fatorial, considerando como fator o tratamento (T1; T2; T3; T4). Obteve-se evidência ao nível de 5% de significância que houve diferença entre os tratamentos em relação a variável comprimento (Tabela 2).

Aplicando o teste de Tukey para a variável comprimento, tem-se a diferença significativa em relação aos tratamentos, sendo que o tratamento controle

apresentou valores maiores, seguido pelos tratamentos 3 e 4, e por último obteve-se o tratamento 2, com os menores valores de comprimento (Tabela 2).

Após 3.864 hpe (161 dpe) foram coletados 50 peixes de cada tratamento e obtidos os valores de comprimento e o peso total dos indivíduos para a verificação dos dados das biometrias finais dos indivíduos (Tabela 3).

Para verificar o comportamento do peso em relação aos diferentes tratamentos e sexo, utilizou-se o modelo do tipo fatorial, considerando como fatores o tratamento (T1; T2; T3; T4) e o sexo (macho/fêmea). Para o fator peso houve uma evidência ao nível de 5% de significância que demonstrou haver diferença entre os sexos, fato este já esperado, devido ao conhecimento de que as fêmeas normalmente apresentam tamanhos maiores do que os machos. Não houve diferenças significativas entre os quatro tratamentos quanto a variável peso (Tabela 3).

Aplicando o teste de Tukey para a variável peso, tem-se a diferença significativa do peso em relação aos sexos (Tabela 4).

Para verificar o comportamento do comprimento em relação aos diferentes tratamentos e sexo, utilizou-se o modelo do tipo fatorial, considerando como fatores o tratamento (T1; T2; T3; T4) e o sexo (macho/fêmea). Para o fator comprimento houve evidência ao nível de 5% de significância que demonstrou haver diferença entre os sexos, fato também esperado, devido ao conhecimento das diferenças de tamanhos entre fêmeas e machos, em que as fêmeas são geralmente maiores (Tabela 3).

Aplicando o teste de Tukey para a variável comprimento, tem-se a diferença significativa do comprimento em relação aos sexos (Tabela 5).

3.3 Quanto a Identificação do Sexo

Durante a realização das análises dos experimentos do presente trabalho de reversão de sexo, foram observadas gônadas de fêmeas em diferentes fases de desenvolvimento ovariano, embora algumas fases observadas com mais frequências que outras.

Nas gônadas das fêmeas de lambaris (Figura 1), foram observados agrupamentos de células com citoplasma escasso e núcleo grande. São células

arredondadas com raras distinções de tamanho (Figura 3A). Identificou-se outros tipos celulares, com semelhanças quanto ao tamanho das primeiras células citadas, citoplasma denso e vesícula germinativa bem evidente (Figuras 3B-F). Todos estes grupos celulares citados acima, são ovócitos em diferentes fases do desenvolvimento.

Em poucas gônadas de fêmeas de lambaris, foi possível observar a olho nú, a presença de ovócitos maduros, grandes e amarelados. Analisando microscopicamente (Figura 3C), ficou evidente a presença de grânulos de vitelo acinzentados preenchendo estes ovócitos.

Alguns ovócitos em atresia puderam ser identificados (Figuras 3D-E).

As gônadas apresentavam vasos sanguíneos, de grande calibre, espessos e densos, percorrendo e se ramificando em porções mais delgadas por toda a extensão da gônada (Figura 3F). Aparentemente, ramificações de vasos sanguíneos circundam todos os ovócitos.

Notou-se também, a presença de uma membrana que envolvia os ovários, possivelmente a túnica albugínea (Figura 3G).

Em algumas regiões da periferia das gônadas, foram observados agrupamentos de células de tamanho reduzido, semelhantes às estruturas observadas nas gônadas dos machos (Figura 3H).

Os testículos (Figura 2) são estruturas maciças e compactas, formadas por pequenas células, filiformes, com aparência típica de espermatozóides (Figura 4A). Foram observadas a presença de vasos sanguíneos e de uma fina cápsula envolvendo os testículos, possivelmente a túnica albugínea (Figura 4B).

3.4 Quanto a Variação da Temperatura

Durante a realização deste estudo, as médias de temperaturas diárias sofreram grandes oscilações, sendo a média de $21,8^{\circ}\text{C} \pm \text{dp}=2$.

As variações de temperatura encontradas durante os meses em que foi realizado o experimento (março à setembro) encontra-se na Figura 5.

A água apresentou as seguintes características durante o experimento: oxigênio dissolvido=6 a 7 mg/L, pH=5,5 a 6,5, e alcalinidade da água=20 mg/L.

Tabela 1: Proporção dos sexos de *A. altiparanae* e aplicação do teste binominal para cada tratamento de reversão sexual.

Tratamento	Fêmea	Macho	Total de indivíduos	% de fêmeas
1 (controle)	22 ^a	28 ^a	50	44 ^a
2 (20 mg/kg)	35 ^b	15 ^b	50	70 ^b
3 (40 mg/kg)	38 ^b	12 ^b	50	76 ^b
4 (80 mg/kg)	38 ^b	12 ^b	50	76 ^b

Valores com letras diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa ao nível de 5%.

Tabela 2: Biometria intermediária de *A. altiparanae* dos quatro tratamentos de reversão de sexo, realizada com 720 hpe (30 dpe), e, submetidas a análise da variância fatorial e aplicação do teste de Tukey, considerando como fator o tratamento (T1; T2; T3; T4).

Tratamento	Peso (g)	Comprimento (cm)
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
1 (controle)	0,137 ± 0,064 ^a	1,972 ± 0,282 ^a
2 (20 mg/kg)	0,064 ± 0,034 ^c	1,587 ± 0,239 ^c
3 (40 mg/kg)	0,082 ± 0,040 ^b	1,718 ± 0,237 ^b
4 (80 mg/kg)	0,085 ± 0,058 ^b	1,713 ± 0,286 ^b

Valores com letras diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa ao nível de 5%.

Tabela 3: Biometria final de *A. altiparanae* dos quatro tratamentos de reversão de sexo, realizada com 3.864 hpe (161 dpe), e, submetidas a análise da variância fatorial, considerando como fatores o tratamento (T1; T2; T3; T4) e o sexo (macho/fêmea).

Tratamento	Peso (g)	Comprimento (cm)
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
1	2,425 ± 1,138	5,610 ± 0,730
2	2,872 ± 1,238	5,812 ± 0,775
3	2,972 ± 1,445	5,844 ± 0,874
4	2,672 ± 0,989	5,660 ± 0,710

Não houveram diferenças significativas, ao nível de 5%, entre os quatro tratamentos de reversão sexual. Houveram diferenças significativas apenas entre os sexos.

Tabela 4: Teste de Tukey aplicado à variável peso durante a biometria final (3.864 hpe ou 161 dpe) de *A. altiparanae* dos quatro tratamentos, considerando o fator sexo.

Tukey	Média (g)	N	Sexo
A	3.0244 ^a	133 ^a	1 ^a
B	2.1621 ^b	67 ^b	2 ^b

Valores com letras diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa ao nível de 5%.
Sexo 1 = Fêmea; Sexo 2 = Macho; N = Número de indivíduos.

Tabela 5: Teste de Tukey aplicado à variável comprimento durante a biometria final (3.864 hpe ou 161 dpe) de *A. altiparanae* dos quatro tratamentos, considerando o fator sexo.

Tukey	Média (cm)	N	Sexo
A	5.9030 ^a	133 ^a	1 ^a
B	5.3910 ^b	67 ^b	2 ^b

Valores com letras diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa ao nível de 5%.
Sexo 1 = Fêmea; Sexo 2 = Macho; N = Número de indivíduos.

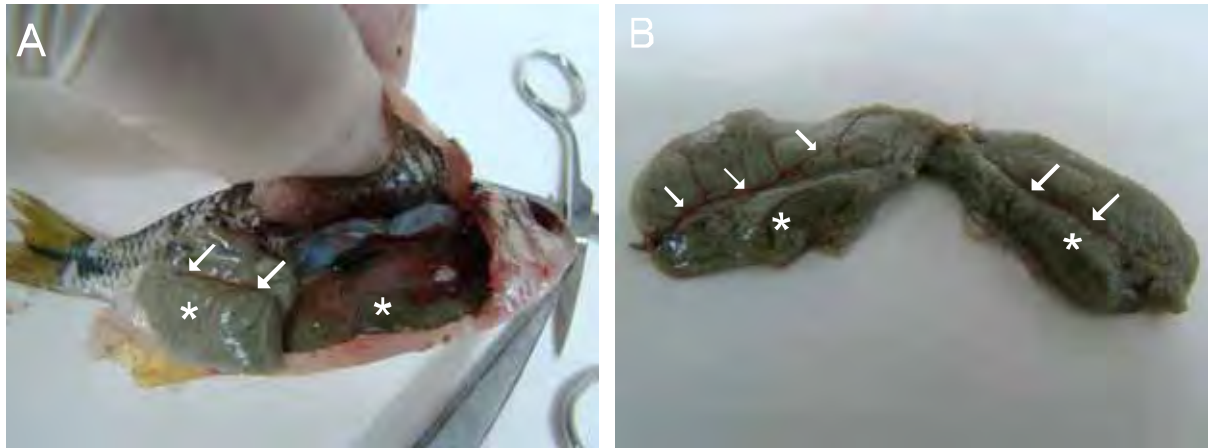


Figura 1: Fêmea adulta de *A. altiparanae* (A) e em destaque sua gônada (B) indicada por asteriscos (*), onde pode-se notar uma extensa ramificação de vasos sanguíneos (→).

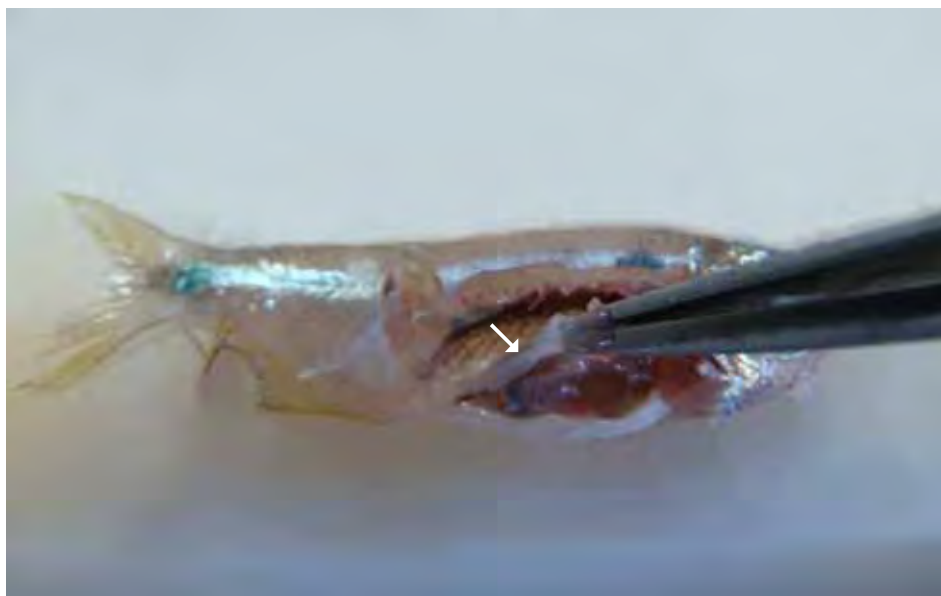


Figura 2: Macho adulto de *A. altiparanae*. A seta indica a gônada do peixe.

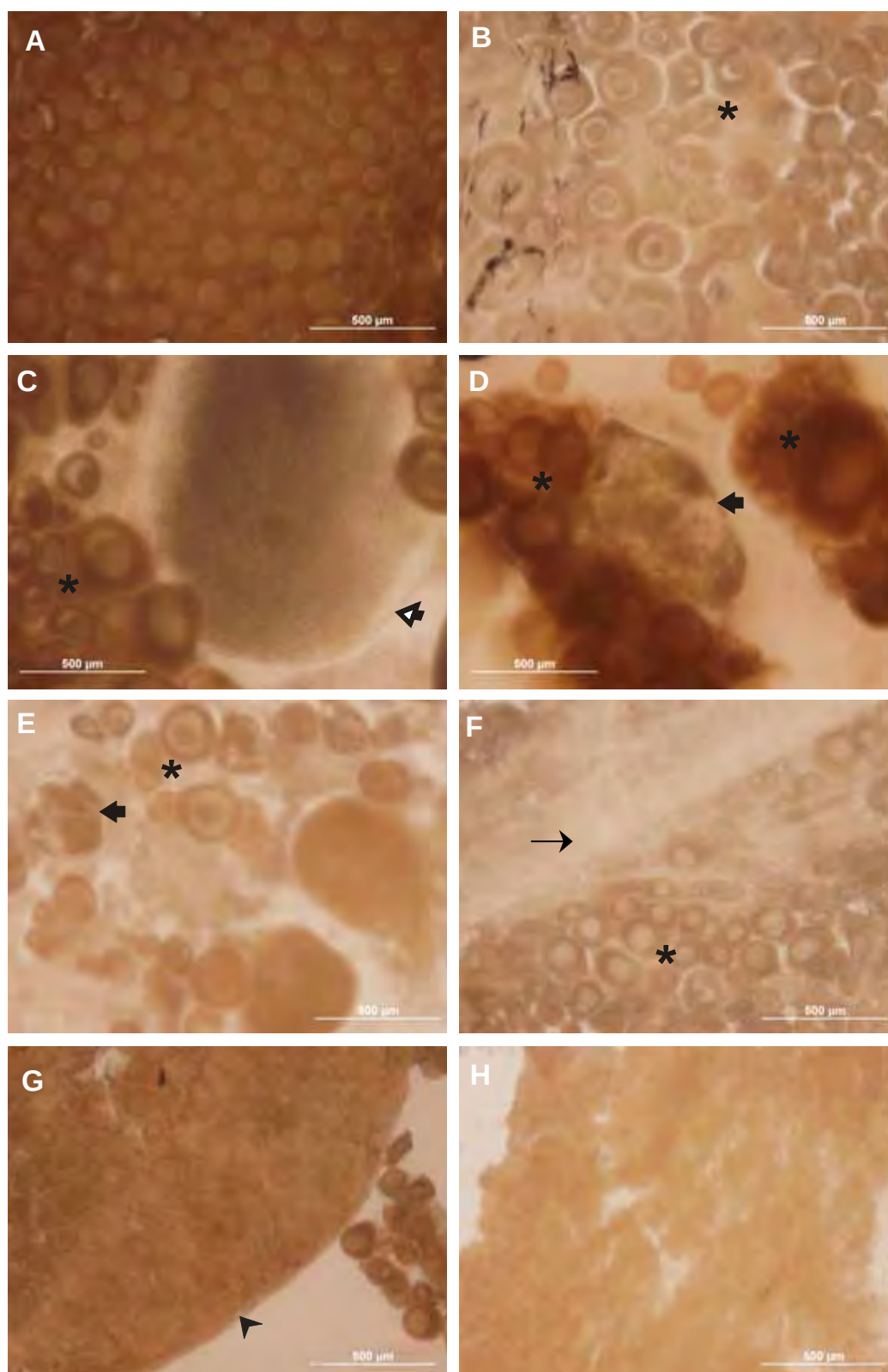


Figura 3: Gônadas de fêmeas de *A. altiparanae* (A - H) coradas pelo carmim acético, em que foram observados ovócitos imaturos (A), regiões povoadas por ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento (* em B – F), sendo possível destacar ovócitos em estágio mais avançado, de vitelogênese (⚡ em C), e presença de células em estágio de atresia (➡ em D - E). Evidencia-se a presença de vasos sanguíneos (➡ em F) e uma fina membrana que envolve os ovócitos (▶ em G). Observou-se uma estrutura diferenciada (H), assemelhando-se as estruturas das gônadas dos machos. A=T1; C, D, E=T2; B, F, H=T3 e G=T4.

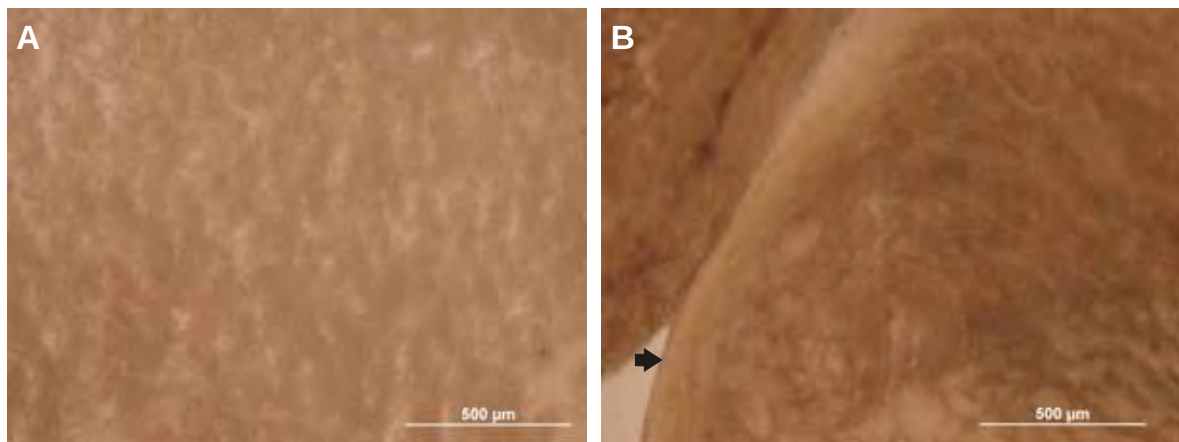


Figura 4: Gônadas de machos de *A. altiparanae* (A - B) coradas pelo carmim acético, onde são observadas estruturas compactas com células pequenas (A) e uma membrana que envolve os testículos, possivelmente a túnica albugínea (➡ em B). A=T2 e B=T4.

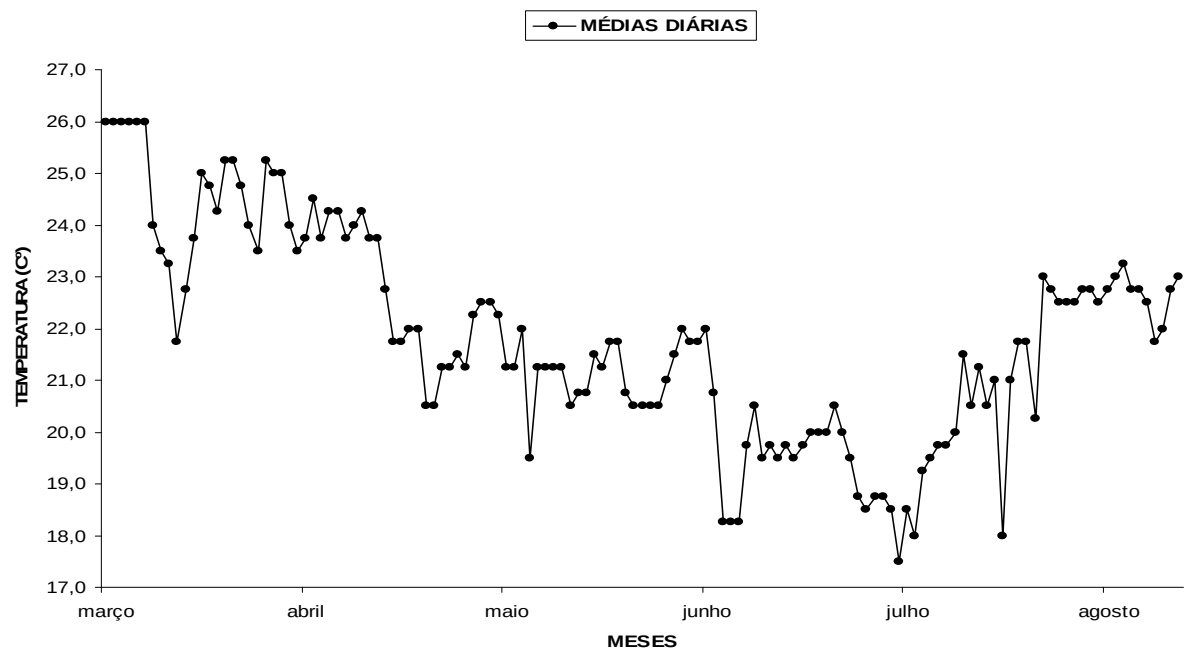


Figura 5: Médias diárias de temperatura durante o desenvolvimento do estudo de reversão sexual em lambaris.

4. DISCUSSÃO

Segundo Bogart (1987), a diferenciação sexual nos vertebrados, e, inclusive a indução do processo de reversão de sexo nos peixes é controlada pela aromatização dos andrógenos a estrógenos, através de um mecanismo molecular interno de controle enzimático da esteroidogênese (BAROILLER et al., 1999; GOVOROUN et al., 2001; LEE et al., 2001, 2002; ROWELL et al., 2002; GONZÁLEZ; PIFERRER, 2003; BHANDARI et al., 2005, 2006; SUNOBE et al., 2005; IWAMATSU et al., 2006).

Os esteróides sexuais são principalmente sintetizados pelas células somáticas gonadais (as células foliculares e as células da teca, nas fêmeas, e as células de Leydig e as células de Sertoli, nos machos) (FOSTIER et al., 1983; GURAYA, 2001), e sua concentração plasmática apresenta variações com relação à diferenciação e maturação gonadais e durante o ciclo reprodutivo (LILEY; STACEY, 1983; FEIST et al., 1990; KIME et al., 1991; GUIGUEN et al., 1993; YEUNG et al., 1993; SNELSON et al., 1997; JOHNSON et al., 1998).

São raros estudos que se tem na literatura quanto ao estudo da reversão sexual em espécies nativas, e a proporção de fêmeas obtidas com o presente estudo em *A. altiparanae*, se faz importante por ser significativa quanto à reversão, se comparada aos trabalhos de Veregue e Orsi (2003), em que a distribuição das frequências percentuais agrupadas mensalmente para proporção sexual de lambaris em ambientes naturais, demonstra que os machos predominaram na maioria dos meses do período estudado, com exceção de abril. Artioli et al. (2003) em estudo sobre o período reprodutivo e alimentação de *A. alburnus* no canal Cornélio, no Rio Grande do Sul, obteve uma proporção sexual de 0,77 fêmea para cada macho em ambiente natural.

Quanto a espécies nativas, Amaral et al. (2008) obtiveram eficácia na feminização do jundiá, *Rhamdia quelen*, utilizando o hormônio 17 β -estradiol. Os autores testaram três diferentes concentrações de hormônio (90, 100 e 110 mg/kg) incorporadas à ração, e todas apresentaram-se eficientes, sendo que a dosagem de 100 mg de hormônio mostrou-se mais eficiente com 88,2% de fêmeas.

Os resultados de feminização, ao contrário dos tratamentos com andrógenos, mostram uma melhor resposta nas larvas mais jovens (BOMBARDELLI; HAYASHI, 2005) indicando que, mesmo sem a definição do período da diferenciação sexual, se

fez importante a aplicação do hormônio em *A. altiparanae* em etapas iniciais do desenvolvimento larval, para garantir a eficácia do tratamento. Porém, se faz necessário o conhecimento do período da diferenciação sexual para que não seja feita a utilização indiscriminada de hormônio sexual.

Em *Oncorhynchus kisutch*, a sensibilidade ao 17 β -estradiol ocorre alguns dias antes (aproximadamente 12 dias) que para a 17 α -metiltestosterona (PIFERRER; DONALDSON, 1989). Para a espécie *Oreochromis niloticus*, também houve melhor efetividade aos tratamentos com estrógeno para larvas mais jovens (BOMBARDELLI; HAYASHI, 2005). Estes resultados podem ser comprovados por evidências histológicas de que, a completa diferenciação sexual nas fêmeas, ocorre antes que nos machos (STRUSSMANN et al., 1996; PIFERRER, 2001).

Ao contrário dos andrógenos, a obtenção do sucesso dos tratamentos com estrógenos parece ser mais difícil de ser alcançado (MCANDREW, 1993), porque os andrógenos são agentes alteradores de sexo mais potentes que os estrógenos, fato que leva à necessidade da utilização de maiores dosagens hormonais para feminizar efetivamente os peixes (HENDRY et al., 2003). Em *A. altiparanae* a utilização de uma quantia maior de hormônio feminizante (40 e 80 mg/kg de ração) apresentou maior eficácia nos resultados de reversão sexual (76% de fêmeas) com relação a uma quantidade menor do hormônio (20 mg/kg de ração) que resultou em um número menor de fêmeas (70%).

Contudo, mesmo utilizando altas dosagens, em algumas espécies como as carpas, o emprego de 17 β -estradiol foi completamente ineficiente (KOMEN; RICHTER, 1993). Esta dificuldade em obter a feminização parece se agravar em procedimentos que utilizem banhos de imersão, chegando a não serem efetivos (PHELPS; POPMA, 2000).

Bombardelli e Hayashi em 2005, obtiveram de 24,05% a 39,20% de feminização de *O. niloticus*, a partir de banhos de imersão com valerato de estradiol, confirmando as afirmações referentes à ineficiência dos tratamentos.

Os resultados de feminização obtidos pelos autores citados acima, tornam-se ineficientes, principalmente, quando comparados com resultados de outros autores como Mélard (1995), que obteve 100% de feminização utilizando suplementação dietética de 200 mg de 17 α -etinilestradiol.kg⁻¹ na dieta, em *O. aureus*. Scott et al. (1989) obtiveram bons resultados de feminização em proles de *O. niloticus*, geneticamente monossexuais masculinas. Estes autores alcançaram resultados de

51,6 e 83,9% em fêmeas, em dois ensaios, utilizando 100 mg de dietilstilbestrol.kg⁻¹ de dieta. A incorporação de estrógenos na ração também foi eficiente na feminização de *Odontesthes bonariensis* (STRUSSMANN et al., 1996).

A temperatura dominante durante a fase inicial de desenvolvimento tem sido considerada como sendo um determinante ambiental para o sexo em muitos peixes gonocorísticos (BAROILLER et al., 1999). Embora a maioria dos estudos sobre os efeitos da temperatura na determinação do sexo concentrem-se em répteis e anfíbios (CREWS, 1996; PIEAU, 1996; DEVLIN; NAGAHAMA, 2002), a termossensibilidade da diferenciação gonadal em peixes também tem sido descoberta em um crescente número de espécies (NAKAMURA et al., 1998; BAROILLER et al., 1999; DEVLIN; NAGAHAMA, 2002) desde a primeira constatação da ação da temperatura na determinação do sexo em “Atlantic silverside”, *Menidia menidia* (CONOVER; KYNARD, 1981).

As periodicidades ambientais são expressas nos peixes sob diversas atividades fisiológicas. No caso da reprodução, as condições do ambiente representam o impulso para desencadear o início dos eventos reprodutivos. Existem constatações de que fatores como temperatura da água, chuvas e fotoperíodo influenciam no ciclo reprodutivo do lambari. O estudo de reversão sexual realizado no presente trabalho, que perdurou de março a setembro de 2008, sofreu grandes oscilações de temperatura que apresentaram médias diárias em torno de 21,8°C ± 2. Sabendo-se que a temperatura ideal para a reprodução desta espécie é entre 26 e 28°C, os lambaris se desenvolveram em temperaturas que desfavorecem seu crescimento, afetando extremamente o desenvolvimento das gônadas.

O desenvolvimento tardio das gônadas, causado provavelmente pelas temperaturas baixas e oscilatórias, tornou necessária a extensão do presente trabalho até que fosse possível a visualização do sexo gonadal do peixe, tanto de forma macroscópica como microscópica.

Baixas temperaturas são conhecidas por induzir a produção de machos primários em *Rivulus marmoratus*. Estudos morfogênicos gonadais mostram que baixas temperaturas atrasam a sexualização e diminuem o índice mitótico das células germinativas. Baixa temperatura também induz um alargamento do estroma da região hilar da gônada em desenvolvimento antes da sexualização das células germinativas (HARRINGTON, 1975).

De acordo com Chan e Yeung (1983), tem sido sugerido que a indução de baixa temperatura em machos primários possa induzir a redução da taxa mitótica das células germinativas e do desenvolvimento do estroma da região hilar; estes efeitos podem retardar o processo das células germinativas masculinas ou suprimir a diferenciação normal das células femininas.

Em oposto às baixas temperaturas, Van den Hurk e Lambert (1982) verificaram utilizando truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, que a alta temperatura no tratamento (22-29°C), aplicada logo após a eclosão e por várias durações, não afeta a proporção sexual. Posteriormente, tratamentos de alta temperatura por um período mais longo foram aplicados na mesma espécie por Baroiller et al. (1999), mas nenhuma reversão de sexo foi obtida. Goto (2000) demonstrou que nenhuma reversão para o sexo masculino ocorreu em salmão masu, *O. masou*, e em truta arco-íris, *O. mykiss*, através de tratamentos de alta temperatura. Por outro lado, Craig et al. (1996) observaram tendência a fêmeas em uma proporção de sexo em peixes criados em alta temperatura durante o desenvolvimento embrionário nas incubadoras, sugerindo que a temperatura de incubação é provavelmente o fator responsável pela mudança na proporção sexual no salmão vermelho, *O. nerka*.

Na maioria dos peixes em que a desova ocorre durante o primeiro ano de vida, a gametogênese é completada em um tempo relativamente curto (JENSEN; SHELTON, 1983); este perfil se enquadra nas características de *A. altiparanae*, uma espécie de crescimento rápido, que segundo Porto-Foresti e colaboradores (2001), chegam à maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade em condições de cultivo, normalmente com 7 a 9 cm de comprimento para os machos e 12 a 15 cm de comprimento para as fêmeas.

Em um estudo sobre a influência do sexo na morfometria e nos índices somáticos de lambari em condições de cultivo, Navarro e colaboradores (2006) chegaram ao resultado de que os índices morfométricos analisados revelaram que as fêmeas criadas separadas dos machos obtiveram melhor crescimento em relação a outros tratamentos em que estão na presença deles. Para desempenho reprodutivo, as fêmeas criadas separadas dos machos apresentaram resultado superior a outros tratamentos. Para machos, a criação na presença das fêmeas apresentou melhor desempenho reprodutivo.

Nikolsky (1963) referiu-se às diferenças sexuais no tamanho corporal e relação peso-comprimento como a forma mais frequente de dimorfismo sexual entre

os peixes. Entre as fêmeas, o tamanho maior é favorecido porque aumenta a fecundidade, enquanto que o tamanho dos machos é afetado pela seleção sexual, sendo que machos maiores desfrutam de certa vantagem reprodutiva (GREENWOOD; WHEELER, 1985; PARKER, 1982; SHINE, 1990).

Durante o período reprodutivo de *A. altiparanae*, diferenças morfológicas nítidas podem ser evidenciadas entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas, além de serem maiores e possuírem o corpo mais arredondado, são frequentemente mais precoces no crescimento do que os machos (PORTO-FORESTI et al., 2005; SATO et al., 2006). Neste período, observa-se melhor nas fêmeas maior irrigação por vasos sanguíneos na região ventral do corpo, principalmente nas bases de inserção das nadadeiras peitorais e ventrais. Os machos são menores, possuem o corpo alongado e no período reprodutivo apresentam a nadadeira anal áspera ao toque devido a presença de espículas, sendo tal característica importante para a sua identificação (PORTO-FORESTI et al., 2005; ANDRADE et al., 1984; BOMBARDELLI et al., 2000). Estas características auxiliaram na identificação do sexo dos peixes após o final do experimento de reversão de sexo realizado no presente estudo.

As gônadas da espécie *A. altiparanae* apresentam-se semelhantes a morfologia descrita por Veregue e Orsi (2003), para *A. scabripinnis paranae*.

No que se refere à morfologia das gônadas, *A. scabripinnis paranae* apresenta estruturas pares e saculiformes e as gônadas situadas dorsalmente na cavidade geral do corpo, posicionadas lateralmente a bexiga natatória e separadas entre si, fundindo-se em sua parte caudal, nas proximidades do poro genital. Externamente, as gônadas são revestidas pelo peritônio visceral e estão ligadas ao dorso da cavidade abdominal através do mesovário (VEREGUE; ORSI, 2003).

As gônadas de *A. altiparanae* assemelham-se também, em seu padrão geral, às demais espécies da família Characidae (NOMURA, 1975; BARBIERI, 1992; BAZZOLI et al., 1998), e as características mais específicas são semelhantes a outras espécies do gênero (BAZZOLI et al., 1998), o que pode ser indicativo de que ocorram padrões reprodutivos semelhantes nesse grupo de peixes, e que provavelmente, estejam envolvidas no sucesso dos lambaris em ocupar os mais diversos habitats, como citado por Garutti e Britski (2000) e Winemiller (1989).

Os ovários de teleósteos foram classificados por Wallace e Selman (1981) e De Vlaming (1983), em três tipos, seguindo o padrão de desenvolvimento ovocitário:

a) “sincrônico total” onde todos os ovócitos encontram-se no mesmo estágio de desenvolvimento, ocorrendo em espécies que desovam uma única vez e morrem; b) “sincrônico por grupos”, onde encontram-se no mínimo duas populações de ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento, característicos de teleósteos que desovam uma vez ao ano e têm curta estação reprodutiva; e c) “assincrônico”, que apresenta ovários contendo todos os estádios de desenvolvimento, característico de espécies que desovam muitas vezes durante o ano e possuem prolongado período reprodutivo (SANTIAGO, 2006). De acordo com o descrito acima, evidenciou-se em *A. altiparanae*, a presença de ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento, podendo sugerir uma assincronia deste processo para a espécie.

Nesta espécie, cuja desova é parcelada, nem todos os ovócitos vitelogênicos presentes nos ovários são, obrigatoriamente, eliminados; muitos deles podem sofrer atresia e serem absorvidos, além de existir a possibilidade de ocorrerem casos de dinâmica diferenciada de desenvolvimento (VAZZOLER, 1996).

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O Brasil já dispõe de razoável tecnologia de criação de espécies nativas, ainda sim, há a necessidade de se conhecer melhor a biologia de algumas que apresentam grande potencial para a piscicultura (CASTAGNOLLI, 1992). A criação de novas espécies de peixes em cativeiro será uma opção importante, pois permitirá um aumento sobre os estoques pesqueiros. Isto indica a necessidade e prioridade de resguardar o setor, requerendo o conhecimento científico da biologia e ecologia de peixes de água doce. É cada vez mais urgente que órgãos públicos e universidades, estudem e selecionem novas espécies que possam contribuir para o desenvolvimento de uma piscicultura sustentável (VAL; HONCZARIK, 1995; VAL et al., 2000).

Desta forma, este trabalho foi realizado na tentativa de contribuir com a ampliação do conhecimento científico quanto ao desenvolvimento gonadal inicial e a efetividade do hormônio valerato de estradiol, na reversão do sexo de uma espécie nativa, o *A. altiparanae*.

Diante dos resultados concluímos que:

1. Não foi observada a diferenciação sexual da espécie *A. altiparanae*, durante a fase inicial do desenvolvimento, correspondente a 206°C dias.
2. Durante a observação do desenvolvimento inicial de *A. altiparanae*, foi possível detectar que a abertura da boca se deu às 19 hpe; a transição da alimentação endógena para a exógena ocorreu entre 43 e 60 hpe.
3. As análises indicaram que o hormônio valerato de estradiol não apresentou influência sobre o crescimento e ganho de peso final dos lambaris, visto que não foram notadas diferenças significativas entre os tratamentos nas biometrias finais.
4. O hormônio valerato de estradiol apresentou-se efetivo para produção de lotes monossexos de *A. altiparanae*. Porém, ainda se faz necessário o estudo de novas dosagens e controles de fatores ambientais para o estabelecimento de uma reversão maior de fêmeas.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F. C.; CRUZ-LANDIM, C. Ocorrência e caracterização ultra-estrutural de "nuage" durante a ovogênese e o início da espermatogênese de *Piractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Teleostei). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, SP, v. 64, n. 3b, 2004.

ALEXANDRINO, A. C.; PHAN, N. T.; PINHEIRO, E. F. G. Caracterização macroscópica das gônadas de curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.9, p. 159-175, 1985.

ALVES, M. D.; GODINHO, H. P. Gonadal differentiation of *Schizodon knerii* (Steindachner, 1875) (Pisces, Anostomidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1/2, p. 237-241, 1987.

AMARAL, H. Jr.; NUNES, M. F. S.; GARCIA, S. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 9, n. 12, 2008. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121208.html>>. Acesso em: Abr. 2009.

ANDERSON, E. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in pipefish, *Syngnathus fuscus*, and killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Journal of Morphology**, New York, US, v. 125, p. 23-60, 1968.

ANDRADE, D. R.; GODINHO, H. P.; RIBEIROS, S. P.; CASTRO, E. F. T. Ciclo reprodutivo anual de lambaris *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) em viveiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG, v. 37, n. 5, p. 435-447, 1985.

ANDRADE, D. R.; MENIN, E.; RIBEIRO, E. S. P. Periodicidade da característica sexual secundária em *Astyanax bimaculatus*. **Revista Seiva**, Salvador, BA, n. 44, v. 93, p. 9-12, 1984.

ANTONELI, F. N. **Perfil morfo-funcional da inversão de sexo em synbranchidae (Teleostei, Synbranchiformes)**. 2006. 164p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

APPLE, H. B.; LEBOUTE, E. M. Masculinização de pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando andrógenos através de tratamentos de imersão. In:

ENCONTRO SUL BRASILEIRO DE AQUICULTURA, n. 3, 1995, Ibirubá. **Anais...** Ibirubá: COTRIBÁ e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995, p.113-119.

ARTIOLI, L. G. S.; PRATES, P. H. S. Jr.; DIEFENTHAELER, F.; FONTOURA, N. F. Período reprodutivo e alimentação de *Astyanax alburnus* no canal Cornélio, Capão da Canoa, no Rio Grande do Sul (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Biociências**, Porto Alegre, RS, v. 11, n. 2, 115-122 p, 2003.

BAKER, I. J.; SOLAR, I. I.; DONALDSON, E. M. Masculinization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17-alpha-methyltestosterone around the time of hatching. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 72, p. 359-367, 1988.

BALINSKY, B. I. **An introduction to Embryology**. 4th ed. Philadelphia: Saunders Company, 648 p., 1975.

BALON, E. K. Types of feeding in the ontogeny of fishes and the life-history model. In: SIMENSTAD, C. A.; CAILLIET, G. M. (Eds.) **Contemporary studies on fish feeding: the proceedings of Gutshop'84**. Dr. Junk Publishers. Dordrecht, p. 11-23, 1986.

BARBIERI, G. Biologia de *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae) do ribeirão do Fazzari. II. Aspectos quantitativos da reprodução. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, SP, v. 52, n. 1, p. 589-596, 1992.

BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 130, p. 399-409, 2001.

BAROILLER, J. F.; GUIGEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v. 55, p. 910-931, 1999.

BAZZOLI, N.; MESQUITA, T. L.; SANTOS, G. B.; RIZZO, E. Análise comparativa da reprodução de *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) nos reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. **BioSystems**, New York, v. 6, n. 6, p. 99-112, 1998.

BEAMS, H. W.; KESSEL, R. G. Oocyte structure and early vitellogenesis in the trout, *Salmo gairdneri*. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, US: University of Pennsylvania, v. 136, p. 105-122, 1973.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, Scotland, v. 197, p. 283-301, 2001.

BHANDARI, R. K.; ALAM, M. A.; HIGA, M.; SOYANO, K.; NAKAMURA, M. Evidence that estrogen regulates sex change of honeycomb grouper (*Epinephelus merra*), a protogynous hermaphrodite fish. **Journal of Experimental Zoology**, New York, US, v. 303, p. 497-503, 2005.

BHANDARI, R. K.; NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **General and Comparative Endocrinology**, California, US: Academic Press, v. 145, p. 20-24, 2006.

BLAXTER, J. H. S. Development: eggs and larvae, p.178-252. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish Physiology**. California, US, Academic Press, 485 p., 1969.

BOCK, C. L.; PADOVANI, C. R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. **Acta scientiarum**, Maringa, PR, v. 22, n. 2, p. 495-501, 2000.

BOGART, M. H. Sex determination: a hypothesis base on steroid ratios. **Journal of Theoretical Biology**, London, GB, Academic Press, v. 128, p. 349-357, 1987.

BOMBARDELLI, R. A.; CAMPAGNOLO, R.; BEUX, L. F.; MAKRAKIS, S.; MARTIN, R. V.; MASSAGO, H. 2000. Determinação da presença de indivíduos machos, fêmeas e intersexuais quanto a análise de efetividade da reversão sexual em tilápias (*Oreochromis niloticus*) na Região Oeste do Paraná, Brasil. **Anais do Simpósio Brasileiro de Aquicultura**. CD ROM.

BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com 17 α -metilttestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 2, p. 365-372, 2005.

BONILAWSKA, M.; FORMICK, K.; WINNICKI, A. Size of eggs and duration of embryogenesis in fishes. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, Polonia, PL, Akademia Rolnicza, v. 30, n. 1, p. 61-71. 2000.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z.; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal. **Manual de identificação**. Embrapa. Serviço de Produção - SPI, Brasília, DF, 184 p., 1999.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco**. Brasília, DF, CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 143p., 1984.

BROWN, L. A.; ROBERTS, R. J. Production of neutered salmonids. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Inglaterra, GB, Pergamon Press, v. 73b, n. 1, p. 177-180, 1982.

BRUSLÉ, S. Fine structure of early previtellogenic oocytes in *Mugil (Liza) auratus* Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae). **Cell and Tissue Research**, New York, US, V. 207, p. 123-134, 1980.

BRUSLÉ, S.; BRUSLÉ, J. An ultrastructural study of early germ cells in *Mugil (Liza) auratus* Risso, 1810 (Teleostei: Mugilidae). **Annales de biologie animale, biochimie, biophysique**, Paris, FR, v. 18, p. 871-875, 1978.

BUCKUP, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. **Ecologia de Peixes de Riachos**. Rio de Janeiro, RJ, Série Oecologia Brasiliensis, PPGE-UFRJ, v. 6, p. 91-138, 1999.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Série livros 23, Museu Nacional, Rio de Janeiro, 195 p., 2007.

BYE, V. J.; LINCOLN, R. F. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 57, p. 299-309, 1986.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 189p., 1992.

CASTILHO-ALMEIDA, R. B. ***Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação**. 2007. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP.

CEMIG – CETEC **Guia ilustrado da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte, 2000. 141p.

CHAN, S. T. H.; YEUNG, W. S. B. **Sex control and sex reversal in fish under natural conditions**. New York, US, Academic Press, p. 171-222, 1983.

CLÉROT, J. C. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens Cyprinidés. **Experimental Cell Research**, v. 120, p. 237-244, 1979.

COMBS, R. M. Embryogenesis, histology and organology of the ovary of *Brevoortia patronus*. **Gulf Research Reports**. Mississippi, n. 2, v. 4, p. 335-429, 1969.

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

CRAIG, J. K.; FOOTE, C. J.; WOOD, C. C. Evidence for temperature-dependent sex determination in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. Canada, v. 53, p. 141-147, 1996.

CREWS, D. Temperature-dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. **Zoological Science**, Japan, v. 13, p. 1-13, 1996.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C.; CRUZ-HOFLING, M. A. Morphological study of the spermatogenesis in the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **BIOCELL**, n. 27, v. 3, p. 319-328, 2003.

CRUZ-LANDIM, C.; CRUZ-HOFLING, M. A. Comportamento dos nucléolos e mitocôndrias durante a ovogênese de peixes teleósteos de água doce. **Acta Amazônica**, Amazônia, AM, v. 9, p. 723-728, 1979.

D´COTTA, H.; FOSTIER, A.; GUINGUEN, Y.; GOVOROUN, M.; BAROILLER, J. F. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 59, n. 3, p. 265-276, 2001.

DAVIES, P. R.; TAKASHIMA, F. Sex differentiation in common carp, *Cyprinus carpio*. **Journal of the Tokyo University of Fisheries**, Tokyo, v. 66, p. 191-199, 1980.

DE VLAMING, V. L. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts. In: RAWKIN, J. C.; PITCHER, T. J.; DUGGON, R. T. **Control processes in fish physiology**. Croolm Helm, London, p. 176-199, 1983.

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

DOITSIDOU, M.; REICHMAN-FRIED, M.; STEBLER, J.; KOPRUNNER, M.; DORRIES, J.; MEYER, D.; ESGUERRA, C. V.; LEUNG, T.; RAZ, E. Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1. **Cell**. Cambridge, MA, v. 111, p. 647-659, 2002.

DROLLER, M. J.; ROTH, T. F. An electron microscopic study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus* Guppyi. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 28, p. 209-232, 1966.

ECKSTEIN, B.; SPIRA, M. Effect of sex hormones on gonadal differentiation in a cichlid, *Tilapia aurea*. **Biological bulletin**, US, v. 129, p. 482-489, 1965.

EDDY, E. M. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. **International Review of Cytology**, New York, US, v. 43, p. 229-280, 1975.

ESTEVES, K. E. Feeding ecology of three *Astyanax* species (Characidae, Tetragonopterinae) from a floodplain lake of Mogi-Guaçu-river, Parana river basin, Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, Netherlands, v. 46, n. 1, p. 83-101, 1996.

FALK-PETERSEN, I. B.; HANSEN, T. K. Organ differentiation in newly hatched common wolfish. **Journal of Fish Biology**, London, GB: Academic Press, v. 59, p. 1465-1482, 2001.

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **O estado mundial da pesca e da aquicultura**. Roma, 2009, 218p.

FEIST, G.; SCHRECK, C. B.; FITZPATRICK, M. S.; REDDING, J. M. Sex steroid profiles of coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*) during early development and sexual differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, California, US, Academic Press, v.80, p. 299-313, 1990.

FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, GB: Academic Press, v. 72, n. 4, p. 297-353, 1981.

FLORES, J. A.; BURNS, J. R. Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). **Cell and Tissue Research**, New York, US, v. 271, p. 263-270, 1993.

FORBERG, K. G. **A histological study of development of oocytes in capelin, *Mallotus villosus villosus* (Muller)**. Journal of Fish Biology. v. 20, p. 143-154, 1982.

FOSTIER, A.; JALABERT, B.; BILLARD, R.; BRETON, B.; ZOHAR, Y. The gonadal steroids. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (eds.). **Fish Physiology**. New York, US: Academic Press, v. 9a, p. 277-372, 1983.

FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. 1. ed. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**, São Paulo, SP, v. 6, p. 1-204, 1948.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)**. Série Zoologia. Porto Alegre, RS, v. 13, p. 65-88, 2000.

GEVERS, P.; DULOS, J.; SCHIPPER, H.; TIMMERMANS, L. P. Origin of primordial germ cells, as characterized by the presence of nuage, in embryos of the teleost fish *Barbus conchoniensis*. **European Journal of Morphology**, Holanda, NL, v. 30, n. 3, p. 195-204, 1992.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 8th ed.. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc, p. 603, 2006.

GISBERT, E.; WILLIOT, P.; CASTELLÓ-ORVAY, F. Influence of egg size on growth and survival to early stages of *Siberian sturgeon* (*Acipenser baeri*) under small scale hatchery conditions. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 183, p. 83-94, 2000.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, MG, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GODINHO, H. P.; SANTOS, J. E.; SATO, Y. Ontogênese larval de cinco espécies do São Francisco, p. 133-148. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.) **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais, Belo Horizonte: CNPq/PADCT**, Editora PUC Minas, MG, 468 p., 2003.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil. Subordem Characidae**. São Paulo, SP: Ed. Franciscana, v. 4, p. 847, 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**, California, US: Academic Press, v. 132, p. 223-230, 2003.

GOTO, R. **Studies on environmental factors influencing sex differentiation in pleuronectid, cyprinid and salmonid fishes**. Teses (PhD), Hokkaido University, Hakodate, Japan, 2000.

GOVOROUN, M.; MCMEEL, O. M.; D'COTTA, H.; RICORDEL, M. J.; SMITH, T.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y. Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Zoology**, New York, US, v. 290, p. 558-566, 2001.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguazu River basin. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 451-453, 2002.

GRANDI, G.; COLOMBO G. Development an early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla anguilla* L., Anguiliformes, Teleostei): A cytological and ultrastructural study. **Journal of Morphology**, New York, US, v. 231, p. 195-216, 1997.

GREENWOOD, P. J.; WHEELER, P. The evolution of sexual size dimorfism in birds and mammals: a hot blooded hypothesis, p. 287-299. In: GREENWOOD, P. J.; HARVEY, P. H.; SLAKTIN, M. (Eds). **Evolution: essays in honour of John Maynard Smith**. Cambridge: Cambridge University Press, 320p., 1985.

GUERRERO, R. D.; SHELTON, W. L. An acetato-carmin squash method for sexing juvenile fishes. **The Progressive Fish-Culturist**, Alabama, v. 36, n. 1, p. 56, 1974.

GUIGUEN, Y.; JALABERT, B.; THOUARD, E.; FOSTIER, A. Changes in plasma and gonadal steroid hormones in relation to the reproductive cycle and the sex inversion process in the protandrous seabass, *Lates calcarifer*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 92, p. 327-338, 1993.

GUIMARÃES, A. C. D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Tissue and Cell**, Inglaterra, GB: Harcourt Publishers Ltd, v. 33, n. 3, p. 241-248, 2001.

GURAYA, S. S. **Comparative cellular and molecular biology of testis in vertebrates**. Trends in endocrine, paracrine and autocrine regulation of structure and functions. Enfield, UK: Science Publishers Incorporated, 91p., 2001.

HACKMAN, E.; REINBOTH, R. Delimitation of the critical stage of hormone-influenced sex differentiation in *Hemihaplochromis multicolor* (Hilgendorf) (Cichlidae). **General and Comparative Endocrinology**, California, US: Academic Press, v. 22, p. 42-53, 1974.

HAMAGUCHI, S. Alterations in the morphology of nuages in spermatogonia of the fish, *Oryzias latipes*, treated with puromycin or actinomycin D. **Reproduction and Nutrition Development**, Japan, v. 33, n. 2, p. 137-41, 1993.

HAMAGUCHI, S. The structure of the germinal dense bodies (nuages) during differentiation of the male germ line of the teleost, *Oryeias latipes*. **Cell and Tissue Research**, Japan, v. 248, p. 375-380, 1987.

HARRINGTON, R. W. Jr. Sex determination and differentiation among uniparental homozygotes of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontidae, Atheriniformes). p. 249-262. In: REINBOTH, R. (ed.) **Intersexuality in the Animal Kingdom**. Springer-Verlag, Heidelberg, 1975.

HARRINGTON, R. W. Jr. Sex determination and differentiation in fishes. p. 4-12. In: **Control of sex in fishes**. SCHRECK, C. B. (ed.). Extension Division, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, US, 1974.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Induced breeding in tropical fish culture. IDRC, x + 144 p.: ill, Ottawa, 1993.

HENDRY, C. I.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; BENFEY, T. J. Gonadal sex differentiation. **Journal of Fish Biology**, London, GB: Academic Press, v. 60, p. 1431-1442, 2002.

HENDRY, C. I.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; BENFEY, T. J. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, p. 769-781, 2003.

HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M. Hormonal sex control and its application to fish culture. 1983. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Eds) **Fish Physiology**, New York, US: Academic Press, v. 9B, p. 223-303, 1983.

IHERING, R. V.; AZEVEDO, P. **As piabas dos açudes nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae)**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, SP, v. 7, p. 75-106, 1936.

IWAMATSU, T.; KOBAYASHI, H.; SAGEGAMI, R.; SHUO, T. Testosterone content of developing eggs and sex reversal in the medaka (*Oryzias latipes*). **General and Comparative Endocrinology**, California, US: Academic Press, v. 145, p. 67-74, 2006.

JENSEN, G. L.; SHELTON, W. L. Gonadal differentiation in relation to sex control of grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Pisces: Cyprinidae). **Copeia: American Society of Ichthyologists and Herpetologists**, US: Allen Press, v. 3, p. 749-755, 1983.

JOHNSON, A. K.; THOMAS, P.; WILSON, R. R. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. **Journal of Fish Biology**, London, GB: Academic Press, v. 52, p. 502-518, 1998.

JOHNSTONE, R.; MACINTOSH D. J.; WRIGHT, R. S. Elimination of orally administered 17 methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (tilapia) and *Salmo gaidneri* (rainbow trout) juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 35, p. 249-257, 1983.

KIME, D. E.; LONE, K. P.; AL-MARZOUK, A. Seasonal changes in serum steroid hormones in a protandrous teleost, the sobaity (*Sparidentex hasta* Valenciennes). **Journal of Fish Biology**, London, GB: Academic Press, v. 39, p. 745-753, 1991.

KNAUT, H.; WERZ, C.; GEISLER, R. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. **Nature**. Philadelphia, USA, v. 421, p. 279-282, 2003.

KOGER, C. S.; TEH, S. J.; HINTON, D. E. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 beta-estradiol or testosterone. **Marine Environmental Research**, Inglaterra, GB: Applied Science Publishers, v. 50, n. 1-5, p. 201- 206, 2000.

KOMEN, J.; RICHTER, C. J. Sex control in carp. In: MUIR, J. F.; ROBERTS, R. J. (Eds.) **Recent advances in aquaculture**. London: Blackwell Scientific Publications, v. 4, p. 78-86, 1993.

KRISFALUSI, M.; NAGLER, J. J. Induction of gonadal intersex in genotypic male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos following immersion in estradiol – 17 beta. **Molecular Reproduction and Development**, New York, US: Wiley-Liss, v. 56, n. 4, p. 495-501, 2000.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male reproductive system fish, p. 20-30. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. California, US: Academic Press, v. 3, 1.072 p., 1999.

LEBRUN, C.; BILLARD, R.; JALABERT, B. Changes in the number of germ cells in the gonads of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first 10 post-hatching weeks. **Reproduction Nutrition Development**, v. 22, p. 405-421, 1982.

LEE, S. T.; LAM, T. J.; TAN, C. H. Increased 21-hydroxylase and shutdown of C17,20 lyase activities in testicular tissues of the grouper (*Epinephelus coioides*) during 17 α -methyltestosterone-induced sex inversion. **General and Comparative Endocrinology**, California, US: Academic Press, v. 126, p. 298-309, 2002.

LEE, Y. H.; DU, J. L.; YEN, F. P.; LEE, C. Y.; DUFOUR, S.; HUANG, J. D.; SUN, L. T.; CHANG, C. F. Regulation of plasma gonadotrophin II secretion by sex steroids, aromatase inhibitors, and antiestrogens in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, US: Pergamon Press, v. 129, p. 399-406, 2001.

LILEY, N. R.; STACEY, N. E. Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish Physiology**. New York, US: Academic Press, v. 9B, p. 1-63, 1983.

LOWE-McCONNELL, R. H. Estudos **Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo, SP: Edusp, 1999.

MACIEL, C. M. R. R. **Ontogenia das larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae)**. 2006. 229 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, MG.

MCANDREW, B. J. Sex control in tilapiines In: MUIR, J. F.; ROBERTS, R. J. (Eds.) **Recent advances in aquaculture**. London: Blackwell Scientific Publications, v. 4, p. 87- 98, 1993.

MEIJIDE, F. J.; LO NOSTRO, F. L.; GUERRERO, G. A. Gonadal development and sex differentiation in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): a light and electron-microscopy study. **Journal of Morphology**, New York, US, v. 264, p. 191-210, 2005.

MÉLARD, C. Production of a high percentage of male offspring with 17 α ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. I – Estrogen sex-reversal and production of F2 pseudofemales. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 130, p. 25-34, 1995.

MITSUIKI, D. **Aspectos morfofuncionais das células de Sertoli de peixes teleósteos**. 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

MORAIS FILHO, M. B.; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus*) do Rio Mogi Guassu**. São Paulo: Ministério da Agricultura, 146p., 1955.

MYLONAS, C. C.; SULLIVAN, C. V.; HISHAN, J. M. Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 13, n. 6, p. 485-493, 1994.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Eds) **Fish Physiology**. New York, US: Academic Press, v. 9, p. 233-75, 1983.

NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X. T.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**, New York, US, v. 281, p. 362-372, 1998.

NAKAMURA, M.; NAGAHAMA, Y. Differentiation and development of Leydig cells, and changes of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 7, p. 211-219, 1989.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, H. Gonadal sex differentiation in tilapia, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. **Bulletin of the Faculty of Fisheries**, Hokkaido University, Japan, v. 24, p. 1-13, 1973.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá, PR: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 378p., 2001.

NAVARRO, R. D.; LANNA, E. A. T.; YASUI, G. S.; RIBEIRO FILHO, O. P.; MATTA, S. L. P.; MACIEL, E. C. S. Desempenho produtivo de alevinos de piaçu (*Leporinus macrocephalus*) em tanque de alvenaria. In: XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 2002, Goiana, GO. **Resumo**. Simbraq, p. 173.

NAVARRO, R. D.; SILVA, R. F.; RIBEIRO FILHO, O. P.; CALADO, L. L.; REZENDE, F. P.; SILVA, C. S.; SANTOS, L. C. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. **Zootecnia Tropical**, v. 24, n. 2, p. 165-176. 2006.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 2nd ed. New York, US: John Wiley & Sons, Inc., 523p., 1984.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4rd ed. New York, US: John Wiley & Sons, 601p., 2006.

NIKOLSKY, G. V. **The Ecology of Fishes**. London, Academic Press, 352 p., 1963.

NILSSON, E.; CLOUD, J. Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, US: National Academy of Sciences, v. 89, p. 9.425-9.428, 1992.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 15, p. 267-271. 2007.

NOMURA, H. Fecundidade, maturação sexual e índice gonadossomático de lambaris do gênero *Astyanax*, BAIRD e GIRARD, 1854 (Osteichthys, Characidae), relacionados com fatores ambientais. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, RJ, v. 35, n. 3, p. 531-547, 1975.

OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**. São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de Zoologia, v. 22, n. 2, p. 454-460, 2005.

ONITAKE, K. Morphological studies of normal sex-differentiation and induced sex-reversal process of gonads in the medaka, *Oryzias latipes*. **Annotationes zoologicae japonenses**. Tokyo, JP: Zoological Society of Japan, v. 45, p. 159-169, 1972.

PDAMED. **Conteúdos em computadores de mão para a área médica**. Disponível em: <http://www.pdamed.com.br/diciomed/pdamed_0001_07386.php> Acesso em: Jan. 2009.

PAIVA, R. **Lambari, de invasor a hóspede**. Revista Globo Rural, v. 11, n. 142, p. 49-53, 1997.

PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 138, p. 1-22, 1995.

PARK, I. S.; KIM, J. H.; CHO, S. H.; KIM, D. S. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, p. 183-193, 2004.

PARKER, G. A. Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. **Journal of Theoretical Biology**, Oxford, v. 96, p. 281-294, 1982.

PATÍÑO, R. Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. **The Progressive Fisheries Culturist**, Bethesda, v. 59, n. 2, p. 118-128, 1997.

PEREIRA, C. R.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; RITTER, F.; SILVA, L. B. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy

e Gaimard, 1824, pisces, teleostei), a south American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, SP, v. 66, p. 1.057-1.063, 2006.

PÉREZ, P. P. P.; BOCANEGRA, F. A.; ORBE, R. I. Reproducción inducida de la doncella *Pseudoplatystoma fasciatum* y desarrollo embrionario – larval. **Folia amazónica**, Peru, PE, v. 12, p. 141-154, 2001.

PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex reversal of tilapia. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E (Eds.) **Tilapia Aquaculture in the Americas**. Louisiana: World Aquaculture Society, v. 2, p. 34-59, 2000.

PIEAU, C. Temperature variation and sex determination in reptiles. **BioEssays**, Inglaterra, GB: Cambridge University Press, v. 18, p. 19-26, 1996.

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

PIFERRER, F.; BACKER, I. J.; DONALDSON, E. M. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **General and Comparative Endocrinology**, California, US: Academic Press, v. 91, n. 1, p. 59-65, 1993.

PIFERRER, F.; DONALDSON, E. M. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 77, p. 251-262, 1989.

PILLAY, T. V. R. **Aquaculture – Principles and Practices**. London: Blackwell Scientific Publications, 575 p., 1990.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). IN: **Espécies nativas para piscicultura**. Santa Maria: Ed UFMS, 468p., 2005.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, RJ, v. 11, n. 67, p. 15-19, 2001.

POSPISIL, J.; SMISEK, J. Relation between the differentiation of the gonad and cytological determination of sex in the carp. **Bul. Vyzk. Ust. Ryb. Vodn.**, v. 7, p. 8-12, 1971.

RAMSDORF, W. A. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda canguiri – UFPR).** Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

REINBOTH, R. Hormonal control of the teleost ovary. **American Zoologist**, California, US: American Society of Zoologists, v. 12, p. 307-324, 1972.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JR, C. F. **Check list of the freshwater fishes of South and Central América.** Porto Alegre, RS: Editora PUCRS, 729 p., 2003.

REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E.; ESQUIVEL, J. R. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, PR, v. 26, n. 1, p. 67-71, 2004.

ROBLIN, C.; BRUSLÉ, J. Ontogenèse gonadique et différenciation sexuelle du loup (*Dicentrarchus labrax*), en conditions d'élevage. **Reproduction Nutrition Development**, v.231, p. 115–127, 1983.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; FENERICH-VERANI, N. Stages of embryonic development of the “Matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pises, Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, SP, v. 27, n. 1, p. 27-32, 2001.

ROMER, U.; BEISENHERZ, W. Environmental determination of sex in *Apogonina* (Cichlidae) and two other freshwater (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, London, GB: Academic Press, v. 48, p. 714-725, 1996.

ROWELL, C. B.; WATTS, S. A.; WIBBELS, T.; HINES, G. A.; MAIR, G. Androgen and estrogen metabolism during sex differentiation in mono-sex populations of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **General and Comparative Endocrinology**, California, US: Academic Press, v. 125, p. 151-162, 2002.

RUTAISIRE, J.; LEVAVI-SIVAN, B.; NYATIA, E.; BOOTH, A. Juvenile intersexuality in the cyprinid fish *Labeo victorianus*. **Cybium**. Paris, FR: Museum National d'Histoire Naturelle, v. 32, n. 2, 232 p., 2008.

SALES, D. S.; FIRETTI, R. **Rastreabilidade com alta tecnologia na piscicultura.** ANUALPEC, São Paulo, SP, v. 2003, p. 323-325, 2003.

SANTIAGO, K. B. **Biologia reprodutiva do pacu *Myleus micans* (Lutken, 1875) (Characidae: Myleinae) do rio São Francisco, região de Três Marias, Minas Gerais.** 2006. 84 p. Dissertação (Mestrado em engenharia de pesca) Universidade Federal do Ceará, CE.

SANTOS, H. S. L. **Histologia de peixes.** São Paulo, SP: Ed. Funep, 80 p., 1981.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 19, n. 1, p. 163-162, 2002.

SAS Institute Inc. SAS/STAT. **User's Guide** Version 6. Cary, NC: SAS Institute Inc. n. 4, v. 1, 2, 1996.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de Zoologia v. 23, n. 1, p. 267-273, 2006.

SATOH, N.; EGAMI, N. Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. **Journal of embryology and experimental morphology**, London, GB: Cambridge University Press, v. 28, p. 385-395, 1972.

SCOTT, A. G.; PENMAN, D. J.; BEARDMORE, J. A. The 'YY' supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 78, p. 237-251, 1989.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zoological Science**, London, v. 6, p. 211-231, 1989.

SENHORINI, J. A. Desenvolvimento larval do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Pisces, Characidae) em viveiros. 1995. Master's Thesis in Zoology, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

SHAHSAVARANI, I. A.; THOMAS, Z. C.; BALLANTYNE, J. S.; WRIGHT, P. A. A novel technique for the separation of yolk from the developing embryonic tissue in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, p. 321-326, 2002.

SHIBATTA, O. A.; ORSI, M. L.; BENNEMANN, S. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E., BIANCHINI, E., SHIBATTA, O. A., PIMENTA, J. A. A. **Bacia do rio Tibagi**. Londrina, 2002.

SHINE, R. Proximate determinants of sexual differences in body size. **American Naturalist**, Chicago, US: American Society of Naturalists, v. 135, p; 278-283, 1990.

SIQUEIRA, C. **Reversão Sexual**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div08.htm>>. Acesso em: Out. 2008.

SNELSON, F. F. Jr.; RASMUSSEN, L. E. L.; JOHNSON, M. R.; HESS, D. L. Serum concentrations of steroid hormones during reproduction in the Atlantic Stingray, *Dasyatis sabina*. **General and Comparative Endocrinology**, California, US: Academic Press, v. 108, p. 67-79, 1997.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. Freeman, New York, n. 3, 1995.

SPECKER, J. L.; CHANDLEE, M. K. Methodology for estradiol treatment in marine larval and juvenile fish: uptake and clearance in summer flounder. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 217, p. 663-672, 2003.

STRUSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F.; TODA, K. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 139, p. 31-45, 1996.

SUNOBE, T.; NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y. Aromatase immunoreactivity and the role of enzymes in steroid pathways for inducing sex change in the hermaphrodite gobiid fish *Trimma okinawae*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, US: Pergamon Press, v. 141, p. 54-59, 2005.

TABATA, Y. A. **Sobrevivência, crescimento e desenvolvimento gonadal em lotes monossexos femininos e de sexos mistos de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, diplóides e triplóides**. São Paulo, 1995. 82p.

Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

TOURY, R.; CLÉROT, J. C.; ANDRÉ, J. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens Cyprinides. **Biochimie**, v. 61, p. 405-413, 1979.

VAL, L. A.; HONCZARIK, A. A criação de peixes na Amazônia: um futuro promissor. In.: VAL, L. A.; HONCZARIK, A. **Criando peixe na Amazônia**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, p. 1-5, 1995.

VAL, L. A.; ROLIN, P. R.; RABELO, H. Situação atual na aquicultura na região norte. In.: VALENTE, W. C.; POLI, C. R.; BORGHETT, J. R. (Ed.). **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq, n. 13, p. 246-265, 2000.

VAN DEN HURK, R.; LAMBERT, J. G. D. Temperature and steroid effects on gonadal sex differentiation in rainbow trout. In: RICHTER, C. J. J.; GOOS, H. J. T. (Eds.) **Proceeding of the international symposium on the reproductive physiology of fish**, 1982. Pudoc, Wageningen, p. 69-72, 1982.

VAN DEN HURK, R.; SLOF, G. A. A morfological and experimental study of sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, New York, US, v. 218, p. 487-497, 1981.

VANDERWALLE, P.; GERMEAU, G.; BESANCENET, P.; PARMENTIER, E.; BARAS, E. Early development of the head skeleton in *Brycon moorei* (Pisces, Ostariophysi, Characidae). **Journal of Fish Biology**, London, GB: Academic Press, v. 66, p. 996-1024, 2005.

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

VEREGUE, A. M. L.; ORSI, M. L. Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae), do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, Londrina, v. 20, n. 1, p. 97-105, 2003.

VYNCKIER, L. Plasma estradiol-17b concentration in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17b benzoate and estradiol- 17b cypionate – a

preliminary study. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, US: Williams and Wilkins, v. 3, n. 1, p. 36-42, 1990.

ZANIBONI-FILHO, E. **Piscicultura das espécies nativas de água doce**. Apostila. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 20 p., 1997.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, California, US: American Society of Zoologists, v. 21, p. 325-343, 1981.

WARTENBERG, H. Human testicular development and the role of the mesonephros in the origin of a dual Sertoli cell system. **Andrologia**, Berlin, DE: Blackwell Wissenschafts Verlag, v. 10, p. 1-21, 1978.

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by androgen immersion. **Aquaculture Research**, Inglaterra, GB: Blackwell Science, v. 34, p. 65-71, 2003.

WASSERMAN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Validação da técnica do acetato-carmim para avaliar o sexo de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 133-139, 2002.

WILLIAMS, C. L.; STANCEL, G. C. Estrogênios e progestogênios. In: GOODMAN, H; GILMAN, T. L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro, RJ: Mc Graw - Hill, v. 8, p. 1.045-1.067, 1996.

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

WOYNAROVICH, E.; HÓRVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília, DF: FAO/CODEVASF – CNPq, (Manual de Extensão), 225p., 1983.

YAMAMOTO, D.; ONOZATO, H. **Electron microscope study on the growing oocyte of the golfish during the first growth phase**. Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University, n. 13, v.2, p. 79-106, 1965.

YAMAMOTO, M. Electron microscopy of fish development. III. Changes in the ultrastructure of the nucleus and cytoplasm of the oocyte during its development in

Oryzias latipes. **Journal of the Faculty of Science** - Zoology. Tokyo, JP: University of Tokyo, v. 4, n. 10, p 335-346, 1964.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish Physiology**. New York, US: Academic Press, v. 3, p. 117-175, 1969.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 33, p. 329-354, 1983.

YEMELYANOVA, N. G. Formation of sex glands and sex differentiation in *Hypophthalmichthys molitrix* in Uzbekistan ponds. **Arhiv biologiceskih nauk**, Soviet Union, SU: Institut Eksperimental-Noj Mediciny, v. 11, p. 53-57, 1976.

YEUNG, W. S. B.; CHEN, H.; CHAN, S. T. H. The "in vitro" metabolism of radioactive androstenedione and testosterone by gonads of the protogynous *Monopterus albus* at different sexual phases: a time-course and seasonal study. **General and Comparative Endocrinology**, California, US: Academic Press, v. 89, p. 313-322, 1993.

YOSHIKAWA, H.; OGURI, M. Gonadal sex differentiation in the medaka, *Oryzias latipes*, with special regard to the gradient of the differentiation of testes. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, JP: Japanese Society of Scientific Fisheries, v. 45, p. 1.115-1.121, 1978.